

ÜBER IMMUNOLOGISCH WIRKSAME
SCHLEIMPOLYSACCHARIDE AUS DER
KAMILLE UND ANDEREN DROGEN

SABINE ODENTHAL

Liss München
1984

Über immunologisch wirksame Schleimpolysaccharide aus der
Kamille und anderen Drogen

Inaugural-Dissertation
zur
Erlangung des Doktorgrades
der
Fakultät für Chemie und Pharmazie
der
Ludwig-Maximilians-Universität
zu München

vorgelegt
von
Sabine Odenthal
aus
München

Mai 1984

1. Berichterstatter: Professor Dr. H. W a g n e r

2. Berichterstatter: Professor Dr. E. R e i m a n n

Tag der mündlichen Prüfung: 12. Juli 1984

I N H A L T S V E R Z E I C H N I S

Seite

A. E I N L E I T U N G	1
B. A L L G E M E I N E R T E I L	2
1.1. Vorkommen und botanische Beschreibung	2
1.2. Verwendung in der Volksmedizin	5
1.3. Chemie und Pharmakologie der Inhaltsstoffe	6
1.4. Pharmakologie und Anwendung von Schleimpoly- sacchariden und Gummen	8
1.5. Bisherige Arbeiten über Kamillenpolysaccharide	12
2. Immunologische Screeningverfahren	14
3. Die klassischen Isolierungsverfahren von Schleimpolysacchariden und anderen Polysaccharid- typen.	16
C. S P E Z I E L L E R T E I L	19
1.1. Gewinnung einer biologisch aktiven Poly- saccharid-Rohfraktion	19
1.2. Screening der Polysaccharid-Rohfraktion	19
1.3. Charakterisierung der Rohfraktion und Weiter- fraktionierung	20
1.4. Isolierung des sauren Schleimpolysaccharids	23
2. Versuche zur Strukturaufklärung	26
2.1. Molekulargewichtsbestimmung	26
2.2. Bestimmung der Zuckerkomponenten	29
2.3. Uronsäurebestimmung	31
2.4. Optische Drehung	32
2.5. Methylierungsanalyse	32
2.6. Reduktionsanalyse	38
2.7. Kernresonanzspektroskopie	40
2.8. Enzymatischer Abbau mit β -Glucuronidase	46
2.9. Partialhydrolyse	46
2.10. Periodatoxidation	49
2.11. Alkalischer Abbau	53
3. Zusammenfassung der Strukturmerkmale	58
4. Kreuzreaktion des Kamillen-Polysaccharides und anderer Polysaccharide mit Pneumokokken-Antiseren	61

D. PHARMAKOLOGISCHER TEIL	71
1. Testung auf antiphlogistische Wirkung	71
2. Immunologische Untersuchungen	74
2.1. Granulozytentest	74
2.2. Biolumineszenz	81
2.3. Carbon-Clearance-Test	85
2.4. Andere Testmodelle	87
3. Zusammenfassung der Testergebnisse	89
E. ZUSAMMENFASSUNG	91
F. EXPERIMENTELLER TEIL	93
1.1. Herkunft der Droge	93
1.2. Herkunft der Antiseren	93
1.3. Herkunft der Testsubstanzen	93
2. Allgemeine Arbeitsmethoden	94
2.1. Physikalisch-chemische Untersuchungen	94
2.2. Säulenchromatographie	95
2.3. Dünnschichtchromatographie	96
3. Spezielle Arbeitsmethoden	97
3.1. Herstellung der Rohfraktion	97
3.2. Isolierung des Kamillenschleimpolysaccharids A	97
3.3. Analytik	98
3.3.1. Molekulargewichtsbestimmung	98
3.3.2. Hydrolyse mit Trifluoressigsäure	99
3.3.3. Carbazoltest zur quantitativen Bestimmung der Uronsäure	100
3.3.4. Darstellung der Alditol-Acetate	100
3.3.5. Darstellung der partiell methylierten Alditol-Acetate	101
3.3.6. Reduktion	102
3.3.7. Periodatoxidation	102
3.3.8. Alkalischer Abbau	103
3.3.9. Partialhydrolyse	104
3.3.10. Immundiffusion	105
3.4. Meßdaten	107
3.4.1. Massenspektren der partiell methylierten Alditolacetate von Polysaccharid A	107

3.4.2. ^{13}C -NMR-Spektroskopie	108
4. Immunologische Testungen	109
4.1. Granulozytentest	109
4.2. Biolumineszenz-Test	111
4.3. Carbon-Clearance-Test	112
G. A N H A N G	117
Chemie der Schleimstoffe	117
H. L I T E R A T U R V E R Z E I C H N I S	126

A. E I N L E I T U N G

Die Kamille, die in der volksmedizinischen und klinischen Therapie auch heute noch einen großen Anwendungsbereich hat, gehört zu den chemisch wie pharmakologisch bestuntersuchten Pflanzen unseres Arzneischatzes. Als Hauptinhaltsstoffe wurden bisher die Sesquiterpene Azulën, Bisabolole, Bisaboloxide, der En-in-Dicycloether und die Summe der Flavonoidverbindungen angesehen. Das ebenfalls schon seit langem bekannte Kamillenschleimpolysaccharid hat, obwohl mit Sicherheit an der pharmakologischen Gesamtwirkung von Kamillenextrakten beteiligt, bisher wenig Beachtung gefunden.

Nachdem man kürzlich sowohl in japanischen als auch in unserem eigenen Arbeitskreis entdeckt hat, daß bestimmte Polysaccharide aus Pilzen und höheren Pflanzen immunstimulierende und antitumorale Wirkungen besitzen, und in einem von uns durchgeführten orientierenden Vorversuch auch für ein Kamillenrohpolysaccharid eine starke in-vitro- und in-vivo-Wirkung auf die zelluläre Immunabwehr festgestellt werden konnte, sollte in der vorliegenden Arbeit der Versuch gemacht werden, das Kamillenschleimpolysaccharid zu isolieren, gelchromatographisch in seine Komponenten aufzutrennen und chemisch aufzuklären. Dabei war als Beitrag zu Struktur-Wirkungsbeziehungen in der Stoffklasse der Polysaccharide durch immunologische Untersuchungen zu klären, welchen Polysaccharidkomponenten die Hauptwirkung zukommt. Um zu prüfen, ob und in welchem Maße auch Schleimpolysaccharide aus anderen Pflanzen immunstimulierende Wirkungen besitzen, sollten einige der prominentesten Vertreter in diese Untersuchungen miteinbezogen werden.

B. ALLGEMEINER TEIL

1.1. Vorkommen und botanische Beschreibung

Chamomilla recutita L. RAUCHERT, zur Familie der Astera-
ceen gehörig, wird auch unter folgenden Synonymen be-
schrieben:

Matricaria chamomilla L.
Chamomilla officinalis K. KOCH
Chamomilla vulgaris K. KOCH
Chrysanthemum chamomilla BERNH.
Leucanthemum chamaemelum LAM.
Chamaemelum sylvestre MATT.
Chamaemelum DOD.

Als Trivialnamen sind im Gebrauch: Echte Kamille,
Deutsche Kamille, Feldkamille, Magdeblume, Mutterkraut,
Matronenkraut, Kleine Kamille, um nur die häufigsten zu
nennen (1). Die Kamille ist eine einjährige Pflanze, die
in Europa und Asien auf Brachland, Getreidefeldern und
an Wegrändern weit verbreitet ist, und auch nach Amerika
und Australien eingeschleppt worden ist. Für kommerzielle
Zwecke wird sie vor allem in den Balkanländern und in
Ungarn kultiviert. Auch in Deutschland wird Kamille an-
gebaut oder aus Wildvorkommen gewonnen.

Die Kamille ist ein einjähriges Kraut von 20 bis 50 cm
Höhe. Sie hat eine dünne Wurzel und einen ästigen, kahlen
Stengel mit wechselständigen, doppelt fiederteiligen
Blättern, die in schmale, flache Zipfel auslaufen. Die
Blütenstände mit hohlem Blütenboden sind endständig.
Die weißen Randblüten - etwa 12 bis 18 an der Zahl -
sind weiblich, während die übrigen Röhrenblüten des Körb-
chens zwittrig sind. Die Kamille blüht in der Zeit von
Mai bis August, ihre Frucht ist eine Achäne. Im Ph.Eur. III,
im 2. AB-DDR, ÜAB 9 und Ph. Helv. VII sind die getrockneten,
hohlen Blütenköpfchen mit den gelben Röhrenblüten und den
weißen Zungenblüten als *Matricariae* (*Chamomillae*) Flos
enthalten. In der Volksmedizin werden ebenfalls fast nur
diese Pflanzenteile verwendet (2,3).

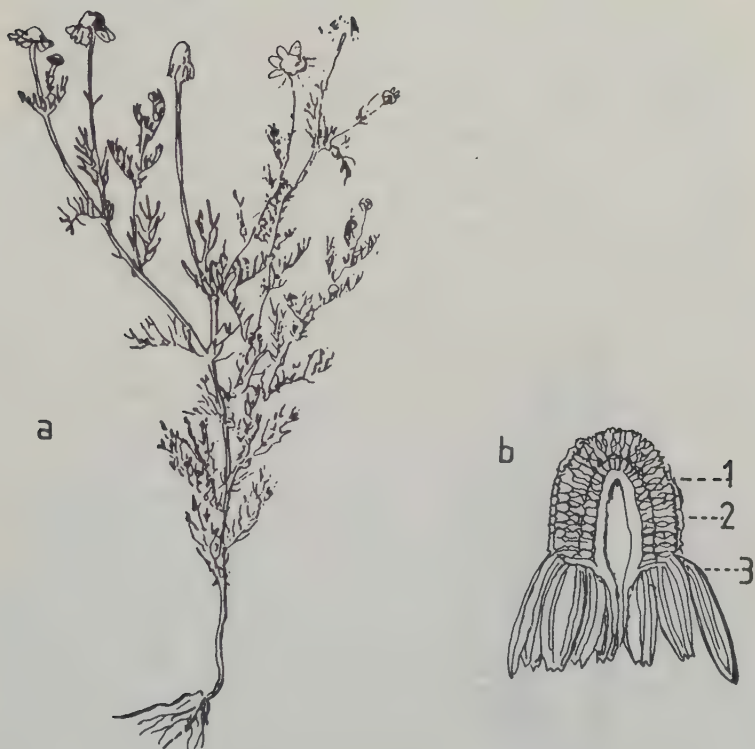


Abb. 1

Habituszeichnung der blühenden Pflanze (3)
Chamomilla recutita L. RAUCHERT, Echte Kamille Asteraceae

a = blühende Pflanze

b = Blütenköpfchen im Längsschnitt
nach BERG und SCHMIDT

1 = Röhrenblüten

2 = Zungenblüten

3 = Infloreszenzachse oder "Blütenboden",
10x vergr.

Das etherische Öl ist in den Drüsenzellen der Epidermis, besonders der Röhrenblüten, lokalisiert. Das typische Kompositendrüsenhaar besteht aus je zwei in 3 - 4 Schichten übereinander liegender niedriger Zellen (1,5). Bei der Kamille und anderen Kompositen-Pflanzen ist der Schleim in sogenannten "Schleimrippen" der Fruchtknoten lokalisiert. Es handelt sich hier um einen Vakuolenschleim im Gegensatz zum Membranschleim, der auf Zellmembranen aufgelagert ist (siehe Abb. 2).

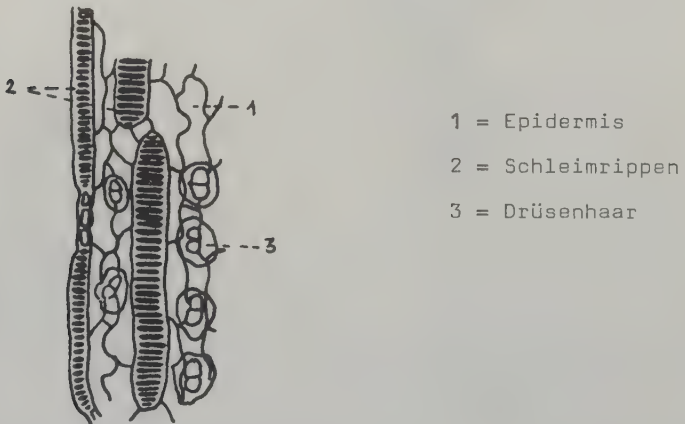


Abb. 2

Fruchtknoten von *Chamomilla recutita*
(nach TSCHIRCH-OESTERLE) (3)

Die physiologische Rolle, die den Schleimsubstanzen zukommt, ist nicht vollkommen geklärt. Der Vakuolenschleim kommt als Reservesubstanz in vielen Sukkulenten vor und dient hier vermutlich in erster Linie als Schutz vor Austrocknung. In Rinden enthaltener Schleim besitzt Schutz-

funktion gegenüber Infektionen und dient als mechanischer Wundverschluß nach Verletzungen (6). Die mit den Schleim-polysacchariden verwandten Gummien werden dagegen nur bei Verletzung der Pflanze spontan gebildet und nach außen sezerniert. Bildungsort der Schleime ist der Golgiapparat.

1.2. Verwendung in der Volksmedizin

Schon im Altertum hatten die Kamillenblüten ein breites Anwendungsspektrum. Bereits GALEN beschreibt die Vorzüge des aus Blütenköpfchen zubereiteten Tees. Ihre heutige Bedeutung kann daran gemessen werden, daß die Kamille bei uns in fast hundert Arzneimitteltzubereitungen zu finden ist (7) und jährlich mehr als 3000 t Rohdroge mit steigender Tendenz allein in Deutschland verbraucht werden (8).

In ihrer Anwendung stehen heute ihre wundheilungsfördernden, entzündungshemmenden, krampflösenden, sowie entspannenden und beruhigenden Wirkungen im Vordergrund. Bei der äußerlichen Anwendung wird vor allem die ausgeprägte antiphlogistische Wirkung ausgenutzt, wobei Umschläge, Spülungen, Bäder, Dampfbäder oder Salbenaufgaben verwendet werden. In der Pädiatrie wird die Kamille in erster Linie wegen ihrer entzündungshemmenden Eigenschaften - zur Pflege empfindlicher Haut - eingesetzt. Bei allopathischer, innerlicher Anwendung der Kamillenpräparate wird ihr antiphlogistischer Effekt und ihre spasmolytische Wirkung ausgenutzt. Gut bewährt hat sich der therapeutische Einsatz bei Erkrankungen des Magen-Darm-Trakts wie akuter Gastritis, Enteritis und Colitis (1,9).

In der Homöopathie findet neben Kamillenblüten auch das ganze Kraut seine Anwendung. Es wird ähnlich wie in der Allopathie bei Katarrhen, rheumatischen Erkrankungen, bei Nervenschmerzen, bei Gastritis und bei Spasmen verwendet.

1.3. Chemie und Pharmakologie der Inhaltsstoffe

Die therapeutische Bedeutung der Kamille ist nach bisheriger Auffassung in erster Linie auf das etherische Öl zurückzuführen. Seine antiphlogistische und spasmolytische Wirkung ist bisher am besten untersucht worden und hier vor allem auf die Terpene (Azulen, Bisabolole) und die Polyine (En-in-Dicycloether) zurückzuführen. Das Öl zeigt außerdem enthaltene cis-Isomere des Polyins ist in seiner spasmolytischen Wirkung dem Papaverin um 50% überlegen. Darüberhinaus wurde für das Etherischöl eine bakterio-statische und fungizide Wirkung nachgewiesen. Das Öl zeigt außerdem infolge Hemmung der Pepsinaktivität auch gute antipeptische und ulkusprotektive Eigenschaften. Diese wird auf Bisabolol und Azulen zurückgeführt (2). Weitere tierexperimentelle Arbeiten über das Kamillenöl betreffen die antiarthritische, schwach antibiotische und fungizide Wirkung. Davon konnte die erste Wirkung besonders den Bisabololen zugeordnet werden. Da mindestens 15% der Terpene auch in wässrige Auszüge übergehen, sind diese Wirkungen nicht nur auf die alkoholischen Gesamtextrakte beschränkt.

Eine weitere Inhaltsstoffgruppe der Kamille stellen die Flavonoide dar. Die Flavonaglyka gehören mit dem Etherischöl zu den lipophilen Bestandteilen, während die Flavonglykoside in den wässrigen Zubereitungen zu finden sind. Unter mehr als zehn verschiedenen Flavonaglyka, die in der Kamille identifiziert wurden, scheinen primär das Apigenin und seine Glykoside spasmolytische Wirkung zu besitzen, während die anderen in der angegebenen Reihenfolge geringere Aktivität besitzen: Apigenin, Quercetin, Luteolin, Kämpferol, Luteolin-7-glucosid, Apigenin-7-glucosid.

Das Apigenin besitzt eine um das dreifache stärkere muskulotrope Wirkung als das Papaverin (9). Einige der lipophilen Flavonoide sollen angeblich die antiphlogistische Wirkung von Hydrocortison erreichen (10).

Das auch in geringen Mengen in den Kamillenblüten nachgewiesene Cholin soll (12) antiphlogistisch wirken.

Von dem in der Kamille nachgewiesenen Coumarin Herniarin ist eine schwache spasmolytische Wirkung beschrieben (11).

Für das Farnesol wurde eine starke Juvenilhormonwirkung gefunden (13).

Daneben wurden noch andere kettenförmige und aromatische Kohlenwasserstoffe isoliert (14).

Eine weitere bisher wenig untersuchte Inhaltsstoffgruppe stellen die Zuckerderivate dar. Es konnten verschiedene Monosaccharide, darunter auch Glucosamin, und Oligosaccharide isoliert werden (15). Sie werden als Biosynthesestufen des schon seit langem bekannten, in seiner Struktur

jedoch noch nicht aufgeklärten, wasserlöslichen Schleim-polysaccharids angesehen (16,17-24). Außerdem wurde ein Pektin isoliert, das der Zellwandstruktur entstammt (25, 26,33). Pharmakologisch wurden die Schleimpolysaccharide der Kamille bisher noch nicht untersucht, obwohl angenommen werden darf, daß sie ebenso wie zahlreiche andere eine antiphlogistische und möglicherweise auch eine immunstimulierende Wirkung besitzen. Ohne Bezug auf definierte Inhaltsstoffe berichtete KIENHOLZ (27) über die Beeinflussung bakterieller Toxine, so der Erythrozyten und Lysotoxine von Staphylokokken durch Kamillenextrakte. Sie beruht offenbar nicht auf einer direkten bakteriostatischen, sondern auf einer antihämolytischen Wirkung. KRAUL und SCHMIDT (28) berichten über die wachstumshemmende Wirkung von Kamillenextrakten auf experimentelle Mäusetumore. Ebenfalls im Ethanolextrakt entdeckten WAR und Mitarb. (29) eine phototoxische und antibiotische Wirkung gegen *Saccharomyces cerevisiae*. SUGANDA (30), der von verschiedenen Alkoholextrakten, auch einen aus der Kamille testete, fand eine Hemmwirkung gegenüber menschlichem Poliovirus 2 und gegen das menschl. Herpesvirus Typ 1.

Während die fungizide Wirkung auf das α -Bisabolol zurückgeführt werden kann, scheint die antivirale Aktivität mehr in den polaren Fraktionen lokalisiert zu sein. Der Wasserextrakt erwies sich als antiviral wirksam (30).

JANSZO (31) und STERN und MILIN (32) fanden eine antiallergische Wirkung von wässrigen Kamillenpräparaten, die auf einer Hemmung der Histaminausschüttung beruhen soll. Ob und inwieweit hieran auch Schleimpolysaccharide beteiligt sind, wird nicht beschrieben, wäre aber aufgrund der im folgenden Abschnitt skizzierten Wirkung bestimmter Polysaccharide auf Immunparameter denkbar.

1.4. Pharmakologie und Anwendung von Schleimpolysacchariden und Gummien

Schleime sind Kohlenhydrate, die mit Wasser viskose, kolloidale Lösungen bilden. Sie sind Polymere, die als Kondensationsprodukte von neutralen Monosacchariden oder deren Säuren gebildet werden. Die Kohlenhydrate bilden eine der größten Naturstoffgruppen und kommen praktisch in allen lebenden Organismen vor.

Aufgrund ihrer strukturellen Komplexität rechnet man auch die sog. "Gummien" zu dieser Polysaccharid-Gruppe. Beide haben - im Gegensatz zu den einfacher aufgebauten Strukturpolysacchariden - die Wasserlöslichkeit und die Viskosität der wässrigen Lösungen gemeinsam (34,51,80). Die Gummien haben zusätzlich noch klebrige Eigenschaften, trotzdem jedoch verwenden viele Autoren die beiden Begriffe synonym (154). In der Therapie dienen Schleimdrogen sowohl zur innerlichen als auch zur äußerlichen Anwendung. In beiden Fällen macht man sich die Eigenschaft der zumeist sauren Schleimpolysaccharide zu eigen, daß sie in Wasser quellen und viskose kolloidale Lösungen bilden. Die Haut oder die Schleimhaut wird mit einer Schutzschicht überzogen und so gegen von außen kommende Reize geschützt.

Extern finden Schleime bei Furunkeln, Ulcus cruris (Kataplasmen aus Foenugraeci Semen und Lini Semen), bei Rhagaden der Haut als Schutz vor Austrocknung (Cydoniae Semen) Verwendung. Bei innerlicher Anwendung wird die Magenschleimhaut vor den durch die Peristaltik des Magen- und Darminhalts und deren Verdauungssäfte bedingten Reizen geschützt (Ceratoniae Fructus). Bei Bronchialkatarrh nutzt man die Eigenschaft der Schleime, die Nervenenden mit einer Schutzschicht zu umhüllen. Dadurch wird der Reiz gemildert und die Abgabe von Bronchialsekret vermindert (Althaeae Radix, Farfarae Folium, Malvae Flos).

Die laxierende Wirkung von Schleimdrogen, wie z.B. Leinsamen oder Flohsamen, beruht auf ihrer Eigenschaft, auf osmotischem Wege Wasser zu binden, und durch den dabei entstehenden Quelldruck die Peristaltik anzuregen.

In der pharmazeutischen Technologie werden Gummen und Schleime als Emulgatoren, Binde- und Sprengmittel und zur Herstellung fettfreier Salbengrundlagen verwendet, um nur einige Beispiele zu nennen.

In den letzten Jahren hat man bei Schleimpolysacchariden auch antiphlogistische und immunstimulierende Wirkungen gefunden.

Die wenigen bisher bekannten Polysaccharide mit antiphlogistischer Wirkung sind nicht oder nur teilweise in ihrer Struktur aufgeklärt. GOLDBERG (35) isolierte aus einem wässrigen Extrakt von *Achillea millefolium* verschiedene kohlenhydrat- und proteinhaltige Fraktionen, die auf das Rattenpfotenödem hemmend wirkten. Ebenfalls noch Stickstoff enthielten die von FLACHSBARTH (37) aus den Kernen von *Sabal serrulata* isolierten sauren Schleimpolysaccharide. Die wirksamste Polysaccharidfraktion zeigte bei einer Dosis von 0.1 mg/kg i.v. eine 65%ige Hemmung am Carrageenin-Rattenpfotenödem. Die Wirkung konnte einem Polysaccharid mit dem Molekulargewicht 100.000 zugeordnet werden, das aus Galaktose (38.4%), aus Arabinose (18.7%) und aus Uronsäuren (14%) besteht und einen Proteinanteil von 3.6% enthält.

Ein neutrales, niedermolekulares Polysaccharid (MG 6000) mit Carrageenin-Ödemhemmender Wirkung wurde von MURAKATI (38) aus *Polygonum cuspidatum* isoliert. Es besitzt eine Hauptkette mit 1,4- verknüpfter Glucose und Seitenketten, die L-Arabinose, L-Rhamnose, sowie endständige Glucose und Galaktose enthalten. Aus *Aloe saponaria* isolierte YAGI (36) ein in gleicher Weise wirksames Polysaccharid mit linearer 1,4 β -Mannanstruktur, das teilweise acetyliert ist und ein Molekulargewicht von 15.000 besitzt. Allerdings erforderte eine Hemmung des Rattenpfotenödems von 65% eine Dosis von 50 mg/kg i.p..

Auf der anderen Seite gibt es aber Polysaccharide, wie das bereits erwähnte Carrageenin aus der Alge *Chondrus crispus*, das zur Induktion von Entzündungen in der experimentellen Pharmakologie verwendet wird. Das Carrageenin besteht aus zwei verschieden verknüpften Galaktanen: ein lineares 1,3 α -verknüpftes und ein sehr verzweigtes 1,3 β -verknüpftes, das noch außerdem 1,4 α - und 1,6 α -Verzweigungen mit Anhydro-Galaktose enthält. Beide Polysaccharide tragen an jedem freien OH in C-4 eine Sulfatgruppe.

MONOLOV (39) fand für einen wässrigen Extrakt aus *Calendula officinalis* eine Antitumor-Wirkung. Über ähnliche Wirkungen berichtet BELKIN und Mitarb. (40) unter anderem von einer wässrigen Rohfraktion aus *Arctium lappa* und *Bryonia alba*. Die verwendeten Polysaccharidfraktionen zeigten nur in vivo, nicht aber in vitro-Aktivität. Die beiden Drogen enthalten Schleimstoffe, werden in der Pharmazie aufgrund ihrer geringen Schleimmenge aber nicht als ausgesprochene Schleimdrogen bezeichnet.

Im Gegensatz zu Polysacchariden aus Bakterien, Algen und Hefepilzen sind bisher nur wenige Schleimpolysaccharide höherer Pflanzen in ihrer Wirkung auf das Immunsystem untersucht worden.

Traganth und arabischer Gummi - die sehr komplex aufgebauten Strukturen sind auf S. 125 wiedergegeben - verhinderten das Angehen eines Aszitestumors, wenn er vor der Transplantation des Tumors gegeben wurde (41). Dieser Befund läßt auf eine unspezifische Steigerung der körpereigenen Immunabwehr, und nicht auf eine direkte cytotoxische Wirkung schließen.

Dagegen wurde für eine aus *Astragalus mongholicus* isolierte Gumme, ein Glucoarabinan mit einem Molekulargewicht von 36.000, eine die Phagozytose- und T-Lymphozyten-stimulierende Wirkung, sowie eine Erhöhung der Plasmazellenzahl beschrieben (42).

DELAVEREAU (43) untersuchte die Phagozytosesteigerung in vivo von verschiedenen, arzneilich zur Wundheilung verwendeten Drogen, darunter auch *Arnica montana* und *Calendula officinalis*, beides Drogen, die u.a. auch Schleim enthalten.

In beiden Fällen war im Methanolextrakt keinerlei Wirkung vorhanden, was auf ein hydrophiles Wirkprinzip hinweist. Wässrige Extrakte von *Malva sylvestris* und *Tussilago farfara* führen andererseits zu einer geringen Stimulation. NEWELL (155) fand gesteigerte Mitoseaktivität von *Saccharomyces cerevisiae* unter dem Einfluß von Guar Gummi, einem Galaktomannan (siehe S. 121), nicht aber von Karaya Gummi (157) einem Rhamnogalakturonan (siehe S. 123).

TOMODA schließlich isolierte Schleimpolysaccharide aus den Blättern und Wurzeln von *Althaea officinalis* (44,45) und *Althaea rosea* (46), sowie aus den Samen von *Plantago major* (84). Es handelt sich um Rhamnogalakturonane mit unterschiedlichen Seitenketten bei *Althaea* spp. und ein 1,4- β -Xylan mit versch. Seitenketten bei *Plantago* (siehe S. 122).

Untersuchungen über bestimmte Wirkungen liegen hier nicht vor.

1.5. Bisherige Arbeiten Über Kamillenpolysaccharide

Die Arbeitsgruppe von JANECKE und Mitarb. (17-24) isolierte zum ersten Mal ein Polysaccharid aus *Chamomilla recutita*. Die Verfasser beschreiben die Gewinnung eines Schleimes aus den Blütenböden der Kamille. Es wurden physikalisch-chemische Daten, sowie die qualitative und quantitative Zuckerzusammensetzung dieses Polysaccharids angegeben.

Hiernach handelt es sich um ein sehr stark verzweigtes Polysaccharid mit einer aus Glucuronsäure und Xylose bestehenden Hauptkette mit mehreren Arabinose, Galaktose, Rhamnose und Glucose enthaltenden Seitenketten.

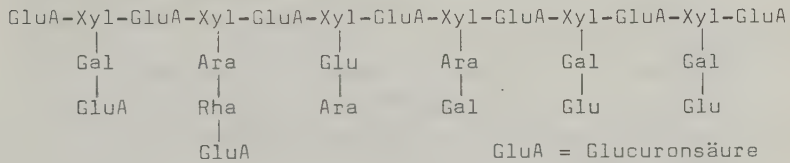
V.BRUCHHAUSEN (16) aus demselben Arbeitskreis gelang es, dieses Polysaccharid noch weiter zu reinigen. Ausgehend von einem wässrigen Extrakt versuchte er das Rohpolysaccharid durch mehrmalige Ausfällungen mit salzsaurem Methanol zu reinigen. Das Molekulargewicht seiner Substanz gab er mit 4880 an. Er bestimmte die quantitative Zuckerzusammensetzung wie folgt:

17 Mol Glucuronsäure
3 - 4 Mol Galaktose
2 - 3 Mol Glucose
3 Mol Arabinose
1 Mol Rhamnose
ca. 1 Mol Xylose

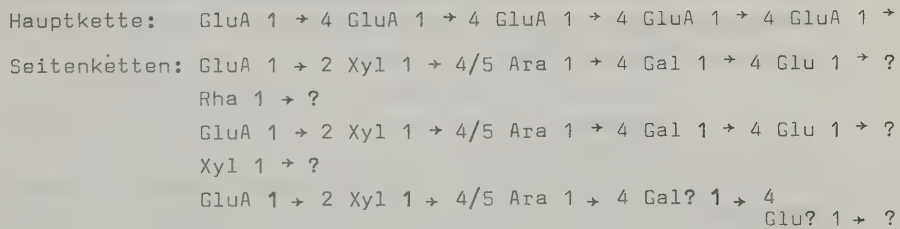
Während JANECKE (24) für die Hauptkette eine alternierende Folge von Xylose und Glucuronsäureeinheiten vorschlug, zog v.BRUCHHAUSEN auch die Möglichkeit einer Hauptkette mit 1,4-verknüpfter Glucuronsäure in Betracht (Tabelle 1, S. 13). Beide Autoren sind sich aber darin einig, daß das Polysaccharid sehr stark verzweigt ist. Bei JANECKE wird die Verzweigung nur über Xylose angegeben, während nach v.BRUCHHAUSEN beide Hauptketten-

Tabelle 1: Strukturvorschläge für das Kamillenpolysaccharid

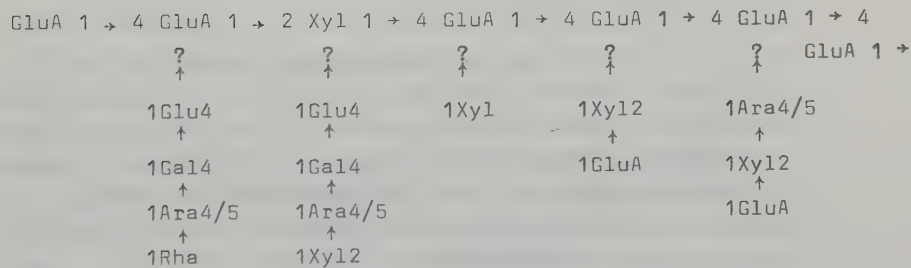
- nach JANECKE 1965 (24):



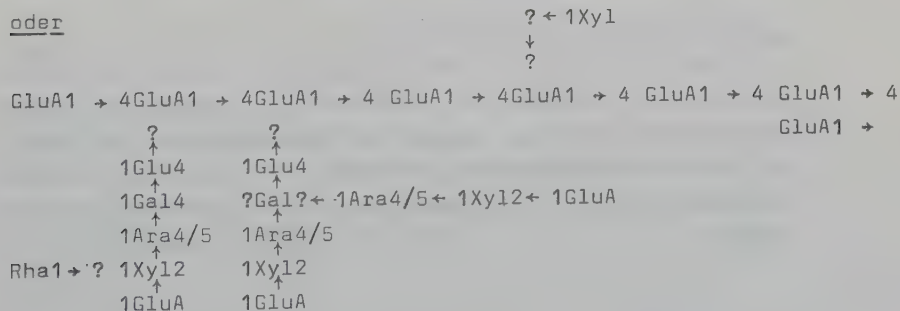
- nach v.BRUCHHAUSEN 1968 (16):



oder



oder



glieder Substituenten tragen können. Die Vorschläge für die Seitenketten sind auch aus Tabelle 1 ersichtlich. Aus der Tabelle 2 sind die Ergebnisse einer kürzlich veröffentlichten Arbeit von GORIN und YAKOVLEV (33,47) über ein Kamillenpektin ersichtlich. Für das sowohl aus *Matricaria recutita* als auch aus *M. matricaroides* isolierte Pektin wird ein über 50%iger Galakturonsäureanteil und ein neutraler Anteil mit den Zuckern Galaktose, Arabinose, Xylose und Rhamnose angegeben.

Tabelle 2: Das Pektin nach YAKOVLEV und GORIN 1977 (33,47)

Hauptkette: - 4 α D-GalA 1 - 4 α D-GalA 1 - 4 α D-GalA 1 -
wenig verzweigt, jedoch vereinzelt auch in der
Hauptkette vorkommend
Gal, Ara, Xyl, - 2Rha 1 -

GalA = Galakturonsäure

2. Immunologische Screeningverfahren

Zur Lokalisierung und Anreicherung des immunstimulierend wirkenden Polysaccharids aus der Kamille sowie für die vergleichenden Untersuchungen verwendeten wir den in-vivo-Carbon-Clearance-Test an Mäusen und die in-vitro-Granulozytenteste nach BRANDT und nach der Chemolumineszenz-Methode. Beide die zelluläre Immunabwehr betreffenden Verfahren haben sich als Screening-Methoden gut bewährt.

Carbon-Clearance (48,87)

In diesem Test wird bei Mäusen die Phagozytose-Aktivität bestimmt, d.h. die Fähigkeit intravenös injizierte Kohle-Partikel zu eliminieren. Teilchen dieser Größe, ca. 100 Å, können nur durch Phagozytose, und zwar über die Makrophagen im Blutserum der Leber (Kupffer-Zellen) oder der Milz eliminiert werden.

Die zu testende Substanz wird i.v. eingespritzt und die Abnahme der Kohlekonzentration im Blut wird spektrophotometrisch verfolgt, indem man jeweils in bestimmten Zeitabständen Blut aus dem retroorbitalen Venen-Plexus der Maus entnimmt.

Zwischen dem Logarithmus der Kohlekonzentration (Extinktion) im Blut und der Zeit besteht ein linearer Zusammenhang. Die negative Steigung der Geraden wird als Regressionskoeffizient bezeichnet. Dieser Koeffizient im Vergleich zu dem Koeffizienten von unbehandelten Kontrolltieren - unter Berücksichtigung des Milz- und Lebergewichts der Mäuse - gilt als Maß für die Phagozytoseaktivität. Sie wird als Carbon-Clearance bezeichnet.

Ist das Verhältnis der beiden Koeffizienten < 1 , so spricht man von einer Suppression der Phagozytoseaktivität. Bei einem Verhältnis von > 1 handelt es sich um eine Stimulation. Dabei wird bis zu 1.5 die DSK-Note 1 und bei Werten größer als 1.5 die Note 2 gegeben.

Granulozytentest (49)

Der Granulozytentest nach BRANDT in einer Modifikation von TYMPNER ist ein in-vitro-Test, der auf der Phagozytierung von Hefezellen basiert. Granulozyten entstammen einer anderen Zelllinie als die Makrophagen. Sie sind polynukleär, von einer Lebensdauer von nur zwei bis drei Tagen, beweglich und zirkulieren im Blut.

Die aus dem Blut angereicherten Granulozyten werden mit Bäckerhefe (*Saccharomyces cerevisiae*) und der zu testenden Substanz während einer bestimmten Zeit inkubiert. Anschließend werden sie fixiert und angefärbt. Unter dem Lichtmikroskop wird die Anzahl der phagozytierten Hefepartikel aus mindestens hundert Granulozyten ausgezählt. Der Phagozytoseindex, in Prozenten ausgedrückt, errechnet sich durch das Verhältnis der phagozytierten Partikel pro 100 Granulozyten mit und ohne Testsubstanz.

Chemolumineszenz (CL)

ALLEN (50) fand erstmals die Bildung von Sauerstoffmolekülen und das Auftreten von Chemolumineszenzen bei der Phagozytose von Granulozyten, während WEIDEMANN (116) dasselbe Phänomen bei Makrophagen nachweisen konnte.

Der Kontakt mit Bakterien oder anderen fremden Materialien führt zu einer gesteigerten O_2 -Abgabe der Phagozyten und zur Erzeugung von verschiedenen, aktivierten Sauerstoffmolekülen ($\cdot O_2^-$, H_2O_2 , 1O_2 , $\cdot OH$), dem sog. "respiratory burst". Neben einer enzymatischen Verdauung soll dieser Sauerstoff die Membranen der phagozytierten Mikroorganismen zerstören. Als Nebeneffekt tritt dabei CL auf. Um die geringe Lichtausbeute der phagozytierenden Zellen zu erhöhen, setzt man Substanzen zu, die durch den Sauerstoff aktiviert werden und ein meßbares Licht erzeugen, wie z.B. Lucigenin oder Luminol. Mit diesen Zusätzen läßt sich die CL-Antwort zwar auf das 10^3 -fache steigern, aber trotzdem benötigt man zur Messung immer noch hochempfindliche Photomultiplier.

Dieses Meßverfahren ermöglicht gleichzeitig die Phagozytose-Aktivität der Zellen zeitabhängig zu messen, d.h. die Stimulierung der Granulozyten kann direkt in Abhängigkeit der Zeit durch den Anstieg der Sauerstoffabgabe gemessen werden. Zu schnellen Routineuntersuchungen wurde ein Mehrkanal-Gerät entwickelt, das die gleichzeitige Messung von verschiedenen Konzentrationen der stimulierenden Substanz - also auch der Dosisabhängigkeit - erlaubt. Zur Standardisierung der Methode dient die Phagozytosesteigerung in Gegenwart von Zymosan.

3. Die klassischen Isolierungsverfahren von Schleimpolysacchariden und anderen Polysaccharidtypen

Nach Herkunft, Lokalisierung, Funktion, Struktur und Eigenschaften unterscheiden wir in höheren Pflanzen die Reservepolysaccharide und die Strukturpolysaccharide (51).

Zur ersten Gruppe, den Reservepolysacchariden rechnet man die Stärke und die Schleime. Ihre physiologische Rolle ist bisher nur unvollständig geklärt. Stärke wird intrazellulär in den Amyloplasten gespeichert, ist also nicht an Zellwände gebunden, quillt leicht in Wasser und kann infolgedessen nach mechanischer Zerstörung der Zellwände gut mit Wasser extrahiert werden.

Die Schleimpolysaccharide, die ebenfalls ungebunden in der Zelle vorliegen, können auch mit Wasser extrahiert werden. Oft werden sie auch mit Salzlösungen extrahiert, um die oft sehr hohe Viskosität herabzusetzen oder um gezielter einzelne Polysaccharidfraktionen in Lösung zu bringen. Im Anschluß an die Wasserextraktion werden sie mit organischen Lösungsmitteln, wie z.B. Ethanol, Methanol oder Aceton ausgefällt.

Zu den Strukturpolysacchariden gehören die Bausteine der primären und sekundären Zellwände (54). Diese bestehen aus Cellulosefibrillen, an die kovalent Glykoproteine zum Zusammenhalt gebunden sind. Die Cellulose selbst ist in Wasser und den üblichen Lösungsmitteln nicht löslich. Auch in der sekundären Zellwand findet man zusätzlich zu den Cellulosefibrillen als weitere Zellwandbestandteile hauptsächlich Pektin und Hemicellulosen.

Pektine kommen in den Zellwänden jeder höheren Pflanze vor. Sie bilden ein komplexes Gemisch von neutralen und sauren Polysacchariden. Meistens ist ein Rhamnogalakturonan kovalent an die neutrale Hemicellulose gebunden. Dieser Pektinanteil der sekundären Zellwand ist dadurch definiert, daß er größtenteils mit heißem Wasser, aber auch mit EDTA oder verdünnter Säure extrahierbar ist. Im Gegensatz dazu kann der neutrale Anteil der Zellwand, die Hemicellulosen, vor allem mit wässrigem Alkali extrahiert werden. In den meisten Fällen handelt es sich um Xylane, Arabinoxylane, Mannane, Arabinogalaktomannane oder Galaktoglucomannane. Die letztgenannten Polysaccharide werden auch zu den sog. "Membranschleimen" gerechnet (53). Die Hauptschwierigkeit bei der Analyse von Hemicellulosen besteht dann darin, chemisch definierte Bestandteile zu isolieren. Dies hat dazu geführt, daß man diese Polysaccharide primär durch die Art der Extraktion als aufgrund ihrer chemischen Struktur bezeichnet hat (52).

Die reine Wasserextraktion ist die schonendste von allen Methoden, und diejenige, die am ehesten gewährleistet, daß genuine Polysaccharide isoliert werden können. Nachteilig ist jedoch, daß hier viele störende Begleitstoffe miterfaßt werden, wie z.B. Proteine, deren Abtrennung deshalb schwierig ist, da sie selber auch gut in Wasser löslich sind.

Klassische Extraktionsmethoden mit Säure oder Base zerstören viele Bindungen: Säure hydrolysiert vor allem auch glykosidische Bindungen, insbesondere die, an denen Arabinose, Fucose und Rhamnose beteiligt sind; Säure kann außerdem die Ester der acetylierten Zucker und die Methylester der Uronsäuren spalten. Base hydrolysiert ebenfalls Esterbindungen und katalysiert die Transeliminierung und β -Elimination von Uronsäuren. Das basische Lösungsmittel kann auch Hemicellulose aus einer nicht kovalenten Bindung mit der Cellulose lösen.

Ein weiteres Problem ist die Reproduzierbarkeit der Isolierungsverfahren. Diese Problematik ist von WILKIE (55) besonders bei den Hemicellulosen diskutiert worden.

C. S P E Z I E L L E R T E I L

1.1. Gewinnung einer biologisch aktiven Polysaccharid-

Rohfraktion

Getrocknete Kamillenblüten wurden zur Entfettung und Entfernung eines Teils störender Begleitstoffe erschöpfend mit Petrolether und anschließend mit Methanol im Soxhlet extrahiert. Der getrocknete Drogenrückstand wurde anschließend bei Raumtemperatur einer wässrigen Extraktion im Turborührer unterzogen, die wässrige Lösung filtriert und abgepreßt. Dieser Vorgang wurde dreimal wiederholt. Dann konzentrierten wir das dunkelbraun gefärbte, sehr viskose Filtrat im Rotationsverdampfer auf die Hälfte des Volumens, wobei darauf geachtet wurde, daß die Temperatur 40°C nicht überschritt. In diesen konzentrierten wässrigen Extrakt tropften wir bei 8°C langsam die vierfache Menge Ethylalkohol ein, was zu einem bräunlichen Niederschlag führte, der nach zwei Tagen abfiltriert wurde. Der Niederschlag wurde erneut mit Wasser aufgenommen und mit der vierfachen Menge Ethylalkohol ausgefällt. Nach zwei Tagen wurde das Präzipitat abzentrifugiert und gefriergetrocknet. Wir erhielten als sogenannte Rohfraktion ein lockeres Pulver von hellbrauner Farbe. Die Ausbeute betrug 6.1 g, entsprechend ca. 4% der eingesetzten Droge.

1.2. Screening der Polysaccharid-Rohfraktion

Im orientierenden Phagozytostest zeigte die Rohfraktion sowohl im in-vivo als auch im in-vitro-Versuch eine deutliche Phagozytosesteigerung. Im Granulozytentest (49) erreichte diese Rohfraktion in einer 0.01%igen Lösung eine Phagozytosesteigerungsrate von ca. 30%. Im Carbon-Clearance-Test war mit der DSK-Note 2 eine gute bis sehr gute Wirkung nachweisbar.

Ähnlich gute Ergebnisse wurden im Viscarin-Carrageenin-Ödem und im Kunststoffpellet-Test erzielt.

Wenig wirksam war die Fraktion im Granulombeutel-Test und im UV-Erythem-Test.

1.3. Charakterisierung der Rohfraktion und Weiterfraktionierung

Der für die Rohfraktion ermittelte Stickstoffgehalt von ca. 1.7% sprach für eine Proteinverunreinigung von 6.7% (56). Eine orientierende Zuckerhydrolyse mit Trifluoressigsäure (siehe Tabelle 3, S. 23) ergab einen Gehalt von ca. 13% Pentosen, Hexosen und Uronsäure, verteilt auf die Zucker Arabinose, Xylose, Galaktose, Glucose, Mannose und 4-O-Methylglucuronsäure. Der geringe Zuckeranteil, der bei dieser Hydrolyse erhalten wurde, ließ entweder einen hohen Gehalt an Uronsäuren vermuten, da diese sehr schwer abzuhydrolysieren sind, oder die Anwesenheit von noch größeren Mengen nicht abgetrennter Verunreinigungen.

Da die Behandlung der Rohfraktion mit Trichloressigsäure zu keinem Niederschlag führte, konnten Proteine nicht in größeren Mengen vorhanden sein. Der Stickstoffgehalt war daher nicht allein auf Proteine zurückzuführen.

Zur weiteren Auftrennung wurde die Rohfraktion einer Gelchromatographie unterzogen. Um einen großen Molekulargewichtsbereich zu erfassen, wählten wir das Gel Sepharose CL-6B, das laut Herstellerangaben (57) für Polysaccharide eine Ausschlußgrenze von ungefähr einer Million besitzt und Polysaccharide im unteren Bereich mit einem Molekulargewicht > 10.000 abtrennt. Als Eluens wurde Wasser verwendet, die Detektion erfolgte mit dem Refraktometer. Das Chromatogramm ist in Abb. 3, S. 21, abgebildet. Da bei dieser Gelchromatographie ein hoher Anteil der Rohfraktion vom Gel absorbiert wurde und die Hauptkomponenten für eine saubere gelchromatographische

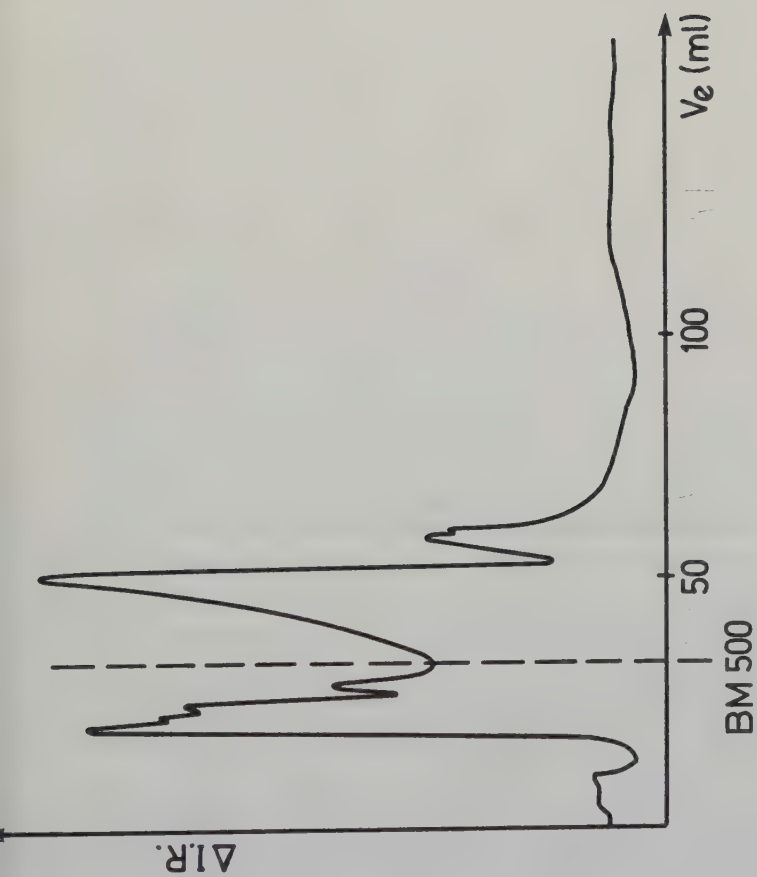


Abb. 3

Gelchromatographie der Kamillenrohrfraktion an Sepharose CL-6B
Eluens: Wasser

Trennung zu dicht beieinander lagen, versuchten wir eine Vortrennung in hoch- und niedermolekulare Substanzen durch Diafiltration. Wir wählten eine Membran, deren Trenngrenze mit Molekulargewicht 50.000 angegeben war.

Diese Molekulargewichtsangabe bezieht sich auf sphärische, nicht geladene Moleküle. Durch diese Filtrationsmethode konnten wir die Rohfraktion in einen hochmolekularen Anteil und einen niedermolekularen Anteil auftrennen. Wie die gelchromatographische Analyse nach der Filtration bewies, war die Trennung in hoch- und niedermolekular nahezu vollständig.

Der Überstand aus der Diafiltration, d.h. die wässrige Lösung der hochmolekularen Substanzen wurde gefriergetrocknet. Wir erhielten ca. 23% der eingesetzten Rohfraktion als hochmolekularen Anteil, d.h. aus 1 g eingesetzter Rohfraktion wurden 0.235 g einer fast weißen Substanz erhalten, während sich die Farbstoffe offensichtlich im niedermolekularen Bereich angereichert hatten, wie die dunkelbraune Färbung des niedermolekularen Anteils bewies. Die Hydrolyse des hochmolekularen Anteils ergab - wie aus Tabelle 3, S. 23, ersichtlich - einen Anstieg des Gesamtzuckergehalts auf 48% gegenüber 13% in der Rohfraktion. Die Hauptkomponenten waren Xylose und Glucuronsäure. Der bestimmte Gesamtzuckergehalt war wiederum wegen der schweren Hydrolysierbarkeit der Uronsäure relativ niedrig.

Der Zuckergehalt der niedermolekularen Fraktion lag bei nur 8%. Sie enthielt also den größten Teil der Verunreinigungen.

Der Stickstoffgehalt im hochmolekularen Anteil war praktisch auf 0 gesunken, so daß in dieser Fraktion die Anwesenheit von Proteinen auszuschließen war.

Im Granulozytentest war die Aktivität hauptsächlich in der hochmolekularen Fraktion lokalisiert (Tabelle 4, S. 24).

Im niedermolekularen Anteil war keine Wirkung mehr feststellbar. Diese Fraktion wurde daher auch nicht im Carbon-Clearance getestet.

Tabelle 3: Zuckerkomponenten der Rohfraktion

	Rohfraktion	Niedermolek. Anteil	Hochmolek. Anteil
Rhamnose	1.1%	0.4%	2.3%
Mannose	1.4	0.7	1.0
Arabinose	3.5	1.9	2.4
Galaktose	2.1	2.0	6.9
Xylose	2.6	0.9	20.7
4-O-Methyl- Glucuronsäure	1.0	-	12.2
Glucose	1.6	2.3	2.4
Gesamt	13.3%	8.2%	47.9%

Hydrolyse: 0.5 N Trifluoressigsäure/ 16 h/ 100°C

1.4. Isolierung des sauren Schleimpolysaccharids

Wegen des relativ hohen Uronsäuregehalts schien es nahe-
liegend, im Anschluß an die Diafiltration eine Auftrennung
durch Ionenaustauschgelchromatographie zu versuchen. Wir
wählten zu diesem Zweck DEAE-Sepharose CL-6B und eluierten
mit einem Gradienten von 0 bis 2 M NaCl. Den Verlauf der
Elution verfolgten wir durch Messung der optischen Dre-
hung (siehe Abb. 4, S. 25).

Wir konnten auf diese Weise einen Hauptpeak bei der Natri-
umchloridkonzentration von 0.5 M/l isolieren. Diese Frak-
tion, 24 Stdn. gegen Leitungswasser und 24 Stdn. gegen de-
stilliertes Wasser dialysiert und anschließend gefrierge-

trocknet, ergab Kamillenpolysaccharid A. Die Ausbeute betrug nur ca. 35% der Auftragsmenge. Offensichtlich wurde - neben den Verlusten bei der Gefriertrocknung - auch hier ein nicht unbedeutender Anteil vom Gel absorbiert. Bei der präparativen Chromatographie wurden pro 150 mg aufgetragener hochmolekularer Rohfraktion ca. 60 mg der Fraktion A erhalten.

Im Granulozytentest hatte sich die Aktivität gegenüber der Rohfraktion und den anderen beiden Fraktionen stark erhöht. Bei den Konzentrationen 0.01% und 0.005% hatte sich die Phagozytosesteigerung sogar verdoppelt.

Der Peak der Fraktion B, der bei der Ionenaustauschchromatographie (siehe Abb. 4, S. 25) kurz vor dem Hauptpeak erschien und nur mit sehr geringer optischer Aktivität detektiert wurde, erwies sich als praktisch inaktiv im Granulozytentest und wurde deshalb nicht weiter untersucht.

Die Tabelle 4 gibt eine Übersicht über die erreichte Anreicherung an biologischer Aktivität.

Tabelle 4: Einfluß auf die Granulozyten-Phagozytose
Phagozytose-Werte nach 60 Min. Inkubation

	0.1%	0.01%	0.005%	0.002%	0.001%
Rohfraktion	4	31	27	24	7
niedermolekul. Anteil	-	-	7	2	-
hochmolekul. Anteil	-	27	7	4	6
Kamillenschleim- Polysaccharid A	19	58	55	55	35

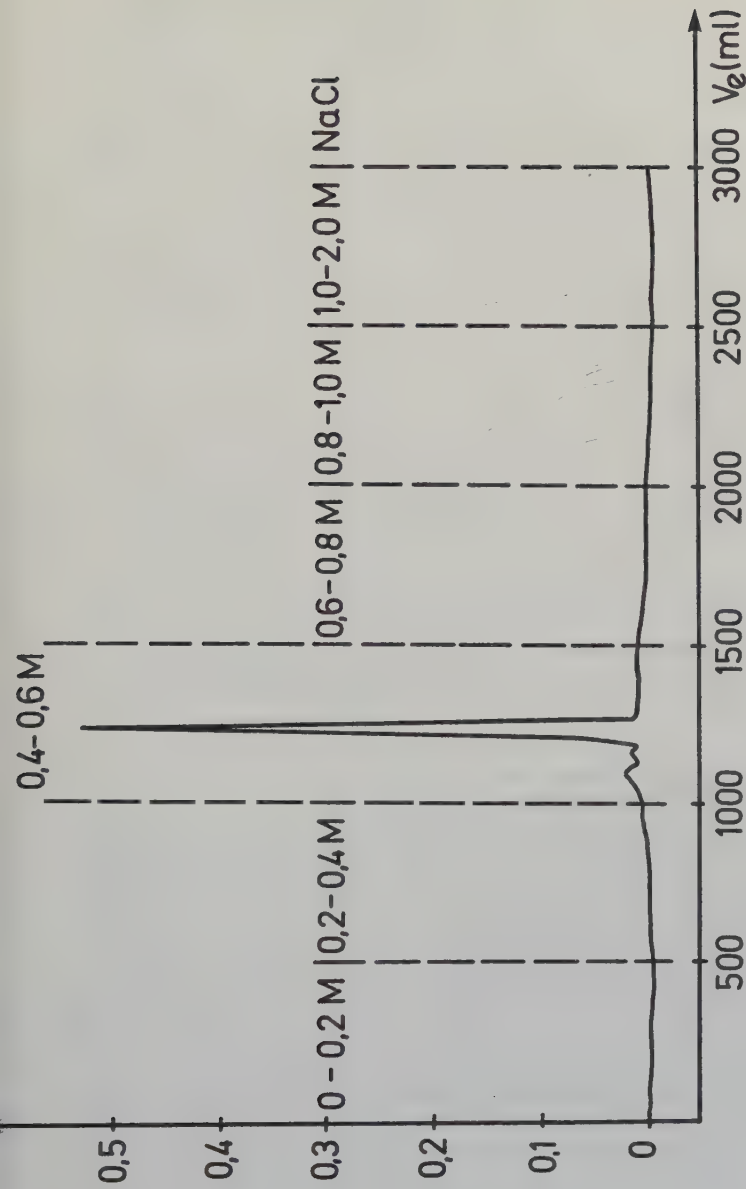


Abb. 4

Auftrennung der hochmolekularen Kamillenpolysaccharidfraktion an DEAE-Sephadex CL-6B
mit einem NaCl-Gradienten von 0 M bis 2 M, Detektion: optische Aktivität

Der Hauptpeak wurde anschließend noch einmal einer Gelchromatographie mit Sephadryl S-500 unterworfen. Dabei war nur ein einziger Peak detektierbar, so daß das Kamillenschleimpolysaccharid A gelchromatographisch als homogen angesehen werden konnte.

Bei der Elektrophorese auf Cellulose-Acetat-Papier im Boratpuffer und mit Toluidinblau-Detektion erhielten wir einen einzigen Fleck.

Die Elementaranalyse ergab 35% C, 0.3% N und 6% H. Der Calcium-Gehalt betrug 0.3%, der Magnesium-Gehalt 0.02%.

2. Versuche zur Strukturaufklärung

Die Strukturaufklärung des rein dargestellten Kamillenpolysaccharid A erfolgte durch die klassischen Methoden der Methylierungsanalyse, Periodatoxidation, Partialhydrolyse und den basischen Abbau, sowie unter Einsatz moderner spektroskopischer Methoden (wie z.B. ^{13}C -NMR, MS u.a.).

Besonders hervorzuheben sei hier die Pyrolyse-Feldionisations-Massenspektrometrie, die bereits einige Male zur qualitativen Analyse von Schleimpolysacchariden eingesetzt wurde (61).

2.1. Molekulargewichtsbestimmung

Die Methoden zur Molekulargewichtsbestimmung von Polysacchariden sind vielfältig. Mit Hilfe der Periodatoxidation können z.B. reduzierende Zucker (63) und gleichzeitig der Verzweigungsgrad des Polysaccharids bestimmt werden. Die Ultrazentrifugation (62) erlaubt über die Sedimentationsgeschwindigkeit im Vergleich zu Eichsubstanzen Aussagen über Molekulargewicht und Konformation des Moleküls. Gleichzeitig kann dabei auch die Homogenität geprüft werden. Die Osmometrie (64-66) verwendet spezielle semipermeable Membranen. Die Molekulargewichtsbestimmung durch Gelchromatographie - ein Verfahren, das methodisch einfach und relativ gut reproduzierbar ist (67) - beruht auf dem gelchromatographischen Vergleich mit geeigneten Eichsubstanzen.

Wir wählten für die Bestimmung des Gel Sephacryl S-500 superfine, das einen Trennbereich von 50.000 bis 2 Mill. umfaßt. Die Säule wurde mit verschiedenen Dextranen kalibriert. Allerdings standen nur lineare Glukane im Molekulargewichtsbereich von 40.000 bis 2 Mill. als Vergleichssubstanzen zur Verfügung.

Das Kamillenpolysaccharid dürfte aber wie die meisten Schleimpolysaccharide eine verzweigte Struktur besitzen. In der Abb. 5, S. 28, ist die Eichkurve wiedergegeben. Unter den erwähnten Bedingungen erhielten wir für das Schleimpolysaccharid A aus der Kamille ein Molekulargewicht von ca. 600.000. Dieser Wert ist deutlich verschieden von den Angaben JANECKES (19) und v.BRUCHHAUSENS (16), die für ihre Polysaccharide Molekulargewichte von ca. 5000 angaben. JANECKE und v.BRUCHHAUSEN erhielten diese Werte durch Dampfdruckosmometrie und Bestimmung der reduzierenden Endgruppen durch äquivalente Reduktion der 3,5-Dinitrosalicylsäure zu einem Nitroaminoderivat.

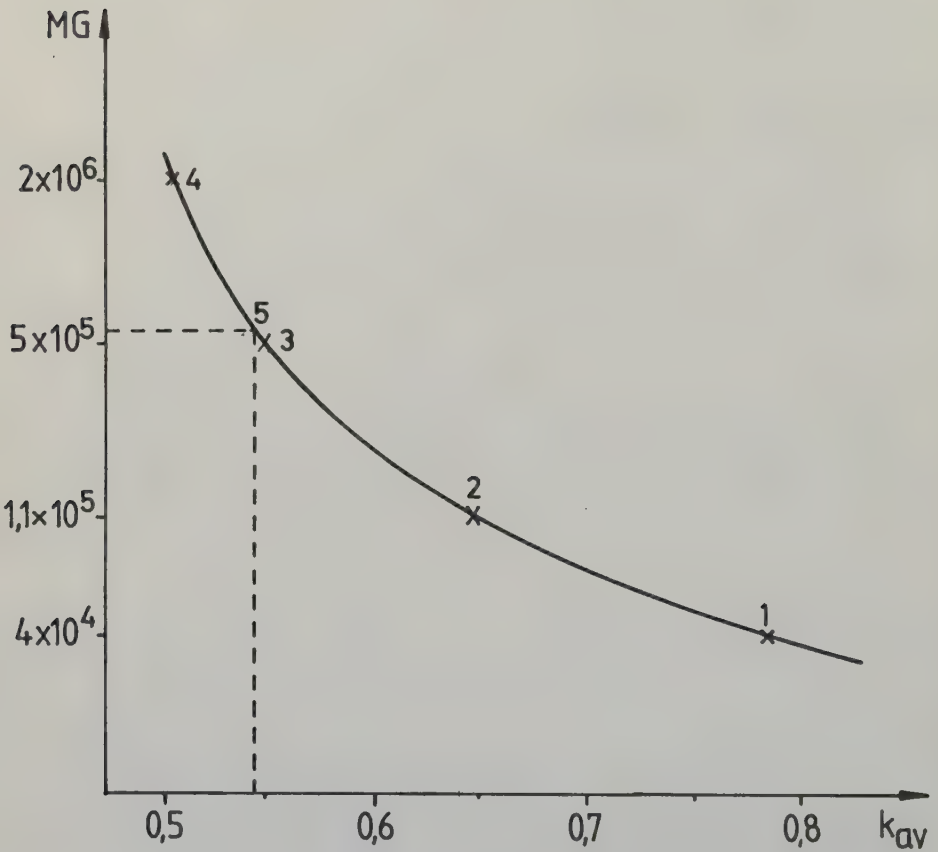


Abb. 5

Eichkurve der Dextrane

k_{ov} = Verteilungskoeffizient

MG = log des Molekulargew.

1 = Dextran T 40

2 = Dextran T 110

3 = Dextran T 500

4 = Dextran 2000

5 = Kamillenschleimpolysaccharid A

2.2. Bestimmung der Zuckerkomponenten

Wir führten die Hydrolyse wie bei früheren Untersuchungen mit Trifluoressigsäure aus. Sie hat den Vorteil, daß die Säure leicht flüchtig ist und daher ohne Schwierigkeiten abgedampft werden kann (68). Nach der DC war ein hoher Anteil an Xylose und Methylglucuronsäure vorhanden, während Hexosen in niedrigerer Konzentration vorlagen. Außerdem waren Zonen im unteren R_f -Bereich zu erkennen, die auf Oligomere hindeuteten bzw. auf Aldobiuronsäuren, die nur sehr schwer hydrolysierbar sind.

Andererseits können Glucuronsäuren unter Decarboxylierung in sehr polare Abbauprodukte mit niedrigen R_f -Werten übergeführt werden (69).

Da z.B. bei unserem komplexen Polysaccharid mit der Anwesenheit der sehr säureempfindlichen Xylose und sehr säureresistenten glykosidischen Bindungen der Glucuronsäure zu rechnen war, führten wir mit 0.5 N bzw. 2 N Trifluoressigsäure 3-, 8- und 32-stündige Hydrolysen bei 100°C durch.

Tabelle 5: Molares Verhältnis der Zuckerkomponenten des Kamillenpolysaccharids A

	0.5 N TFA		2N TFA	von
	8 h	16 h	32 h	BRUCHHAUSEN 1)
				(16)
Rhamnose	0.05		0.15	0.06
Mannose	0.01	0.036	-	-
Arabinose	0.16	0.07	0.08	0.017
Galaktose	0.2	0.15	0.16	0.2
Xylose	1.0	1.0	1.0	0.06
4-O-Methyl-Glucuronsäure	0.95	0.4	0.7	1.0
Glucose	0.05	0.08	0.08	0.15
Zucker gesamt in %	25.0	40.2	21.4	keine Angaben in %

1) H_2SO_4 2 N / 100°C / 2 Stdn.

Die Ergebnisse und quantitative Auswertung durch den Zucke-
analysator Biotronik ZA 5100 (70) ergaben für die neutralen
Zucker und die 4-O-Methyl-glucuronsäure die in der Tabelle 5
angegebene Zusammensetzung.

Daraus ergibt sich, daß das von uns isolierte Kamillen-
schleimpolysaccharid A in der Hauptsache aus Xylose und
Methylglucuronsäure besteht, und zwar zu fast gleichen Teil-
len. Man erkennt ferner, daß Arabinose schnell abhydroly-
siert und dann offenbar auch teilweise abgebaut wird. Dies
ist nicht erstaunlich, da sie als Pentose meist in furano-
sidischer Form vorliegt und daher empfindlich gegen Säure-
behandlung ist. Rhamnose wird erst langsam freigesetzt.
In geringerem Maße gilt das auch für die Glucose. Bemerkens-
wert sind der Anstieg am Anfang und die folgende Abnahme
der Glucuronsäure mit zunehmenden Hydrolysezeiten. Der hohe
Anteil an Glucuronsäure erklärt auch den gemessenen relativ
geringen Gesamthexose/pentose-Anteil in dem Polysaccharid.

Beim Vergleich mit den von JANECKE und von v.BRUCHHAUSEN
isolierten Polysacchariden (16,24) fällt der hohe Uronsäure-
gehalt auf, der in unserem Polysaccharid mit der Xylose
etwa gleich ist, während die Glucuronsäure bei v.BRUCHHAUSEN
den Hauptbestandteil des Polysaccharids ausmacht. Von der
Xylose abgesehen ist aber die qualitative Zuckerzusammen-
setzung und ihr molares Verhältnis in etwa dieselbe:

Rhamnose-Arabinose-Galaktose-Glucose = 0.05:0.1:0.2:0.1.

V.BRUCHHAUSEN hydrolysierte mit 2 N H_2SO_4 / 10 Stdn., mit
0.5 N HCl/ 15 Stdn. und mit 95% $HCOOH$ / 12 Stdn. bei jeweils
100°C. Dieser unterschiedliche Xylosegehalt läßt sich mög-
licherweise mit der Säureempfindlichkeit der Xylose und der
Bildung von Xylobiuronsäuren erklären. Dies erklärt aller-
dings nicht, weshalb die gefundenen Arabinosegehalte in
etwa gleich sind, denn die Arabinose ist ebenso säureempfind-
lich. Eine mögliche Erklärung für den von v.BRUCHHAUSEN (16)
gemessenen geringen Gehalt an Xylose könnte die von ihm

durchgeführte zweitägige salzsaure Hydrolyse sein. Da im Zuckeranalysator keine Zuckersäuren detektiert werden, wurde das Hydrolysegemisch auf DC im Laufmittel Chloroform-Methanol-Wasser (95:5:1) untersucht, da z.B. Galakturonsäure im Pflanzen-Pektin - so auch im Heißwasserextrakt von *Chamomilla recutita* nach YAKOVLEV (33) - enthalten ist.

Wir konnten keine weitere Säure detektieren, so daß die Anwesenheit von Pektin in dem von uns isolierten Kamillenschleimpolysaccharid A ausgeschlossen werden kann.

2.3. Uronsäurebestimmung

Eine relativ genaue Bestimmungsmethode des Uronsäuregehalts ist die Carbazolbestimmung nach DISCHE (71,72), modifiziert nach BITTER und MUIR (73).

Durch Erhitzen mit konzentrierter Schwefelsäure wird das Polysaccharid schnell und quantitativ gespalten, die freigesetzte Uronsäure mit Carbazol umgesetzt und spektrophotometrisch gemessen. BITTER und MUIR (73) konnten die Reproduzierbarkeit und Sensitivität des Verfahrens durch Zugabe von Borat verbessern.

Für das Kamillenschleimpolysaccharid ermittelten wir einen Gehalt von 34% Glucuronsäure, was mit den Hydrolyseergebnissen übereinstimmt, bei der 4-O-Methyl-glucuronsäure ermittelt wurde. Man kann daraus schließen, daß der gesamte im Polysaccharid vorliegende Säureanteil als 4-O-Methyl-glucuronsäure vorliegt.

V.BRUCHHAUSEN ermittelte demgegenüber durch Decarboxylierung den Gehalt mit 50,5% und durch Titration mit 48,2%. Nach Reinigung seines Polysaccharids über einen Kupferkomplex stieg der Uronsäuregehalt sogar auf 57,4%. Auch v.BRUCHHAUSEN fand nur Glucuronsäure und keine Galakturonsäure.

2.4. Optische Drehung

Die optische Drehung für das Kamillenschleimpolysaccharid A beträgt: $+98.22^{\circ}$ bei Raumtemp. in H_2O , Konz. 1 mg/ml . Durch diese Messung kann ausgeschlossen werden, daß es sich bei dem Polysaccharid um eine Hemicellulose bzw. ein Glucuronoxyylan handelt, denn nach TIMELL (74) haben diese Polysaccharid-Typen aufgrund der vorherrschenden β -Verknüpfung der Xylosen und dem relativ geringen Anteil an α -verknüpften Glucuronsäuren immer einen negativen Drehwert.

2.5. Methylierungsanalyse

Die am häufigsten verwendeten Permethylierungsmethoden in der Polysaccharid-Reihe sind jene nach HAWORTH (75), PURDIE (75) und HAKOMORI (76). Letztere ist die heute am häufigsten angewandte Methode, da sie meistens bereits nach einmaliger Methylierung zur kompletten Methylierung führt. Eine Wiederholung verhindert nach Erfahrung von LINDBERG und Mitarb. (79) die Untermethylierung nicht. Im Gegensatz dazu hat TOMODA (44,45,84) alle von ihm bearbeiteten Pflanzenschleime zwei- bis viermal methyliert. Trotzdem gelingt eine vollständige Methylierung oft deshalb nicht, weil während der Hydrolyse und Derivatisierung partielle Entmethylierungen stattfinden. Außerdem können Verluste an flüchtigen, methylierten Zuckern während des Einengens (insbes. trimethylierte Pentitolacetate und trimethylierte-Deoxy-hexitolacetate) (77) entstehen. Hinzu kommt, daß z.B. ein veresterter Uronsäurerest bei einer zweiten Methylierung, insbesondere wenn die Uronsäure zusätzlich am C-4 substituiert ist, durch β -Eliminierung in einen ungesättigten Rest übergeht (siehe Abb. 12, S. 53). Diese Nebenreaktion hat dann Konsequenzen, wenn die Uronsäure auch am C-1 verknüpft ist. Eine weitere Unsicherheit,

die sich bei der Interpretation der Ergebnisse ergeben kann, entsteht dann, wenn bei der Hydrolyse Aldobiuronsäuren und deren Abbauprodukte gebildet werden. Bei dieser Reaktion gehen sowohl die Uronsäuren als auch der mit ihr glykosidisch verbundene Zucker verloren (78,79).

Wegen des hohen Uronsäuregehaltes im Kamillenschleimpolysaccharid methylierten wir einmal nach HAKOMORI, um die β -Elimination so gering wie möglich zu halten. Nach Hydrolyse und Derivatisierung wurden die Hauptbestandteile des Kamillenschleimpolysaccharids A im GC/MS (OV-225 und Sil-CH-7A) mit 1,5-Di-O-acetyl-2,3,4,6-tetra-O-methyl-glucitol als Referenzsubstanz anhand der Vergleichsspektren nach JANSSON und Mitarb. (77) identifiziert und die Konzentrationen nach Kapillarchromatographie an OV-1701 durch Integration bestimmt (siehe Tabelle 6, S.

Die Derivate der Xylose lieferten die Hauptpeaks D und F; sie konnten als 1,4,5-Acetyl-2,3-methyl-xylitol und 1,3,4,5-Acetyl-3-methyl-xylitol identifiziert werden. Demnach liegt die Xylose einmal als Kettenglied 1,4-verknüpft (oder 1,5 verknüpft, wenn furanosidisch) und zum anderen als Verzweigungspunkt vor. In beiden Fällen kann nicht angegeben werden, ob die Xylose Pyranose- oder Furanose-Struktur hat. Wahrscheinlicher ist die Pyranoseform, da bisher nur diese in Pflanzenpolysacchariden aufgefunden worden ist (74,80).

Ca. 10% der Xylose muß endständig vorliegen, denn der Peak B mit der RT von 0.83 deutet auf 2,3,5-Methyl-Xylitol hin. Wegen des hohen Verzweigungsgrades, der aus dem hohen Anteil an monomethylierter Xylose hervorgeht, müssen demnach auch noch andere Zucker endständig gebunden vorliegen. Im Chromatogramm ist ein geringer Anteil an 1,4-Di-O-acetyl-2,3,5-O-methyl-arabinitol vorhanden (Peak A), was auf eine endständige, furanosidische Arabinose schließen läßt (Abb.7). Außerdem kommt auch die 4-O-Methyl-glucuronsäure als endständiges Glied in Frage.

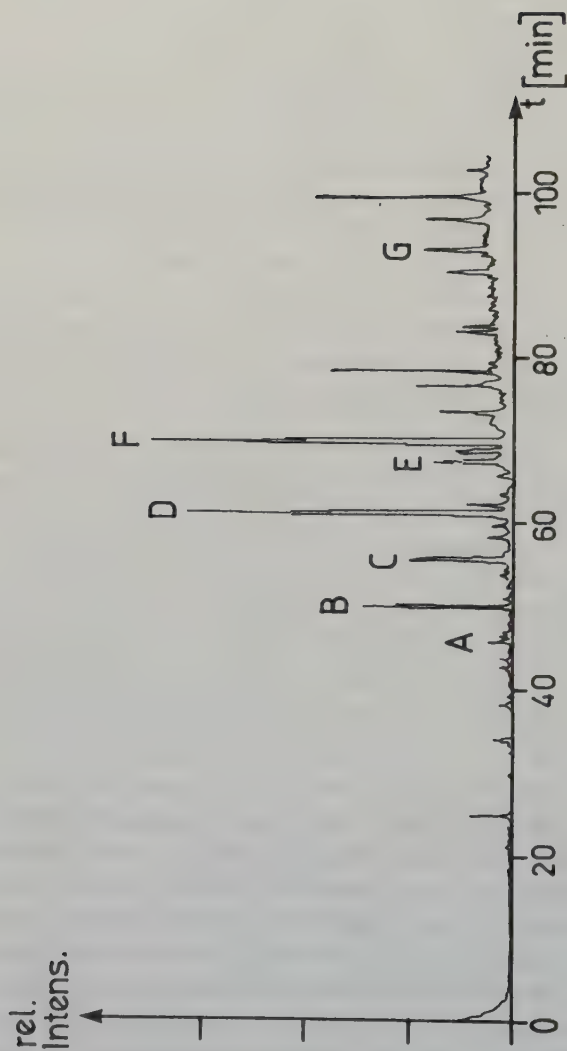


Abb. 6

Ionenchromatogramm der partiell methylierten Alditol-Acetate von Polysaccharid A
an OV 1701

Da nur Spuren an peracetyliertem Glucitol (Peak G) erschienen - sie erscheint als einzige Hexose in unserer Methylierungsanalyse - muß die Methylierung nahezu vollständig erfolgt sein. Die beiden Peaks C und E mit den Retentionszeiten 0.93 und 1.11 (OV 1701) liefern die für partiell methylierte Pentitolacetate typischen Massenspektren: zusätzlich erscheint in diesen beiden Spektren ein Massenpeak bei 147, der in den Spektren von JANSSEN und Mitarb. nicht dokumentiert ist. Er scheint aber für glucuronsäurehaltige Polysaccharide charakteristisch zu sein, wie die Vergleichsanalyse mit einem Glucuronoxylan aus Eupat.perfol. bewies (81).

Vergleicht man unsere Ergebnisse mit denen von v.BRUCHHAUSEN, der zuerst nach HAWORTH und anschließend noch dreimal nach der Methode von KUHN (BaO, AgO) (16) methyliert und dann die Uronsäuren mit LiAlH_4 reduziert hatte, so fallen die sehr unterschiedlichen Ergebnisse auf: neben verschiedenen partiell methylierten und acetylierten Hexitolen, Glucose und Galaktose, erhielt v.BRUCHHAUSEN ein 3,4-methyliertes Xylitol, was für eine 1,2-verknüpfte Xylose spricht. Die Arabinose kommt bei ihm nur als Kettenglied 1,5-verknüpft vor (siehe Tabelle 7, S. 36). Diese Diskrepanz war schon bei der Totalhydrolyse erkennbar, besonders hinsichtlich des Xyloseanteils. Dies ist sicherlich auch auf die wesentlich drastischeren Methoden zurückzuführen, die v. BRUCHHAUSEN bei der Reinigung des Polysaccharids angewendet hat und ganz besonders die Schwierigkeiten bei der Identifizierung der methylierten Derivate ohne Hilfe des MS.

Tabelle 6: Methylierungsanalyse

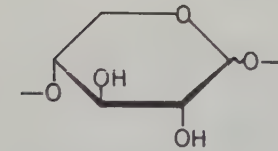
Peak	RT ¹⁾	molares Verhältnis	Alditolacetate	Charakteristische Bruchstücke (m/e)
A	0.76	0.1	1,4-Di-O-acetyl-2,3,5-tri-O-methyl-arabinitol	43, 44, 117, 129, 45, 101, 87, 71
B	0.84	0.9	1,5-Di-O-acetyl-2,3,4-tri-O-methyl-xylitol	43, 117, 118, 101, 102, 161, 162, 44, 45, 87, 88, 58, 59
C	0.93	1	1,4,5-Tri-O-acetyl-2,3-di-O-methyl-pentitol	43, 118, 87, 44, 102, 59, 88, 147, 45
D	1.02	4	1,4,5-Tri-O-acetyl-2,3-di-O-methyl-xylitol	43, 118, 129, 87, 102, 189
E	1.11	0.9	1,2,4,5-Tetra-O-acetyl-3-O-methyl-pentitol	43, 87, 129, 44, 117, 58, 147, 130
F	1.17	5	1,2,4,5-Tetra-O-acetyl-3-O-methyl-xylitol	43, 118, 129, 130, 87, 88, 189, 190, 44
G	1.60	in Spuren	Hexa-O-acetyl-glucitol	43, 115, 116, 103, 44, 145

1) bezogen auf 1,5-Di-O-acetyl-2,3,4,6-tetra-O-methyl-glucitol

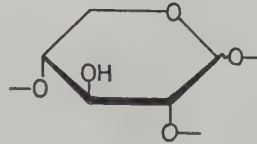
Säule: OV-1701

Tabelle 7: Die partiell methylierten Alditolacetate des
Kamillenpolysaccharids nach v.BRUCHHAUSEN

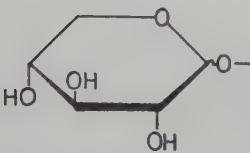
	Verknüpfung
2,3,4-Tri-O-methyl-glucuronsäure	GluA (1→
2,3,4-Tri-O-methyl-glucose (nach Reduktion)	+6) Glu (1→
2,3,4-Tri-O-methyl-rhamnose	Rha (1→
2,3,4-Tri-O-methyl-xylose	Xyl (1→
2,3-Di-O-methyl-arabinose	+5) Ara (1→
3,4-Di-O-methyl-xylose	+2) Xyl (1→
2,3,6-Tri-O-methyl-galaktose	+4) Gal (1→
2,3,6-Tri-O-methyl-glucose	Glu (1→



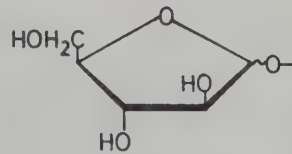
→4) Xylose_p (1→



→2,4) Xylose_p (1→



Xylose_p (1→



Arabinose_f (1→

Abb. 7

Verknüpfungsstellen der Zucker von Kamillenpolysaccharid A

2.6. Reduktionsanalyse

Zur quantitativen Bestimmung der Uronsäuren werden die Carboxylgruppen vor oder nach der Permethylierung mit einem deuterierten Reduktionsmittel (NaBD_4) reduziert, das reduzierte und permethylierte Polysaccharid hydrolysiert und die Spaltprodukte in die Alditolacetate umgewandelt. Der von der Glucuronsäure stammende Glucoseanteil unterscheidet sich dann im MS von der nativen Glucose durch die Deuterierung am C-6: $\text{D}_2\text{C-OAc}$ (Abb. 8).

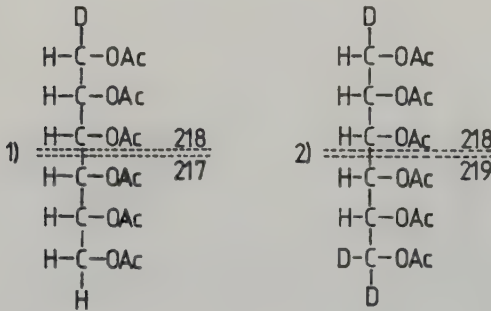


Abb. 8

- 1) = Alditol aus Glucose
 2) = Alditol aus reduzierter
 Glucuronsäure

Die Reduktionsmethode hängt von dem Grad der Löslichkeit des Polysaccharids in Wasser oder im organischen Lösungsmittel ab. Da das Polysaccharid aus Kamille durch den hohen Anteil an Uronsäuren nicht in Tetrahydrofuran löslich war - was zu der methodisch wesentlich einfacher durchführbaren Reduktion mit Lithiumaluminiumhydrid (82) notwendig ist - wählten wir die Methode nach TAYLOR (83), bei der die Säuren in wässrigem Milieu in ihre Lactone übergeführt und dann reduziert werden. TOMODA (84,44,45) modifizierte diese Methode für Schleime dahingehend, daß er die Reduktionsvorgänge drei- bis viermal wiederholte.

Das Ergebnis war negativ. Im Chromatogramm des GC/MS waren dieselben partiell methylierten Alditolacetate zu detektieren wie nach der einfachen Methylierungsanalyse.

Zur Bestätigung dieses Befundes führten wir einen Doppeldiffusionstest nach OUCHTERLONY gegen Anti-Pneumokokkenserum Typ 2 durch (siehe auch S. 61), das spezifisch für endständige, nicht reduzierende Glucuronsäure ist. Da die Reduktion laut Methylierungsanalyse nicht gelungen war, hätte die verbleibende Glucuronsäure mit dem Antiserum reagieren müssen. Es wurde jedoch keine Präzipitationslinie sichtbar, obwohl wir die fast zehnfache Menge an reduziertem Polysaccharid einsetzten, als die Menge an nativem Kamillenpolysaccharid die noch eine positive Reaktion ergab. Das deutet daraufhin, daß ein Teil der Glucuronsäuren reduziert oder daß das Polysaccharid so verändert worden war, daß keine intakten Uronsäurereste mehr zur Reaktion zur Verfügung standen.

2.7. Kernresonanzspektroskopie

Die Kernresonanzspektroskopie von Polysacchariden hat vor allem durch die seit einigen Jahren zur Verfügung stehenden oligomeren Vergleichssubstanzen große Fortschritte erzielt.

Die Interpretation der Spektren ist jedoch dann erschwert, wenn die "repeating units" aus mehreren Zuckern bestehen, da hier zu viele nicht mehr zu unterscheidende Signale in zu engem δ -Bereich erscheinen.

Die für Zucker typischen Resonanzen lassen sich im ^{13}C -NMR-Spektrum in fünf verschiedene Bereiche einteilen: Die anomeren Kohlenstoffatome liegen im Bereich $\delta = 97 - 108$ ppm, wobei Signale >100 ppm für β -Konfiguration sprechen, während jene <100 ppm für α -Konfiguration typisch sind.

Die nicht anomeren Kohlenstoffatome, an die eine Methoxy-Gruppe gebunden ist (bzw. glykosidisch gebundene Kohlenstoffatome), liefern Signale im Bereich $\delta = 76 - 85$ ppm.

Die nicht anomeren Ringkohlenstoffatome (furanosidisch oder pyranosidisch) erscheinen zwischen $\delta = 70 - 85$ ppm. Methoxykohlenstoffatome treten in dem Bereich bei $\delta = 55 - 62$ ppm in Erscheinung und Carboxylgruppen findet man bei ca. $\delta = 175$ ppm.

Für die pyranosidisch gebundenen Zucker gelten noch zusätzlich folgende Regeln: bei der Methylierung einer Hydroxygruppe wird das Ringkohlenstoffatom um 8 bis 11 ppm nach tieferem Feld verschoben. Die Glykosidierung führt zu einer Verschiebung des Ringkohlenstoffatoms von 5 - 8 ppm nach tieferem Feld (86).

Das ^{13}C -NMR des Kamillenpolysaccharids zeigt 19 Signale, was auf drei Hauptzucker schließen läßt. Dies wird auch durch drei Signale im anomeren Bereich bei $\delta = 101.69$ ppm bei 101.28 ppm und bei 97.53 ppm bestätigt. Nach der quantitativen Zuckeranalyse besteht das Polysaccharid aus den beiden Hauptkomponenten 4-O-Methyl-glucuronsäure und Xylose. Die anderen Zucker sind nur zu weniger als 10% vorhanden und sollten daher kaum im Spektrum in Erscheinung treten, da Zucker nur dann detektiert werden können, wenn ihr Anteil im Polysaccharid über 5% liegt (87). Aus der Methy-

lierungsanalyse geht hervor, daß die Xylose unterschiedlich verknüpft ist, so daß zwei der drei Signale im anomeren Bereich der Xylose zugeordnet werden können.

Mit Hilfe der Signalintensitäten kann eine vorläufige Zuordnung bzw. Unterscheidung getroffen werden. Infolge der geringeren freien Beweglichkeit des "backbone" im Vergleich zu den Seitenketten ergeben sich für die Zucker aus dem "backbone" breite, weniger gut aufgelöste Signale aufgrund geringerer spin-spin-Relaxationszeiten (T_2) gegenüber den schmalen, scharfen Signalen aus der Seitenkette, die eine kurze T_2 besitzen (86).

Infolgedessen kann man folgende Signale als zu einem Zucker zugehörig erkennen (siehe Abb. 9, S. 42 und Tab. 8, S. 43): 176.4, 97.5, 82.2, 72.15, 71.24 und 59.5 ppm.

Aus dem Diffusionstest (siehe S. 61) war bekannt, daß die 4-O-Methyl-glucuronsäure endständig, nicht reduzierend vorliegt, wobei allerdings aufgrund dieser Tests nicht sicher auf α - oder β -Verknüpfung geschlossen werden konnte. Die Säure liegt im tiefen Feld bei 176.4 ppm. Sie muß als freie Säure vorliegen, da sie sonst um 5 ppm nach höherem Feld verschoben gewesen wäre (88,89). Das anomere Proton liegt bei 97.5 ppm, was ebenfalls auf α -Verknüpfung hinweist (90). Die anderen gut aufgelösten, scharfen Signale mit ungefähr gleicher Intensität lassen sich ebenfalls der Glucuronsäure zuordnen: das Kohlenstoffatom C-4, das methoxyliert ist, liegt bei 82.2 ppm. Die Ringkohlenstoffatome C-2, C-3 und C-5 erscheinen bei 71.24, 72.15 und 72.6 ppm. Das Kohlenstoffatom der Methoxygruppe am C-4 findet man bei 59.5 ppm (89-91).

Das relativ schwache Signal bei 53 ppm könnte von der Methylgruppe einer teilweise veresterten Säure stammen, da auch ein Signal für die veresterte Säure bei ca. 171 ppm erscheint (89).

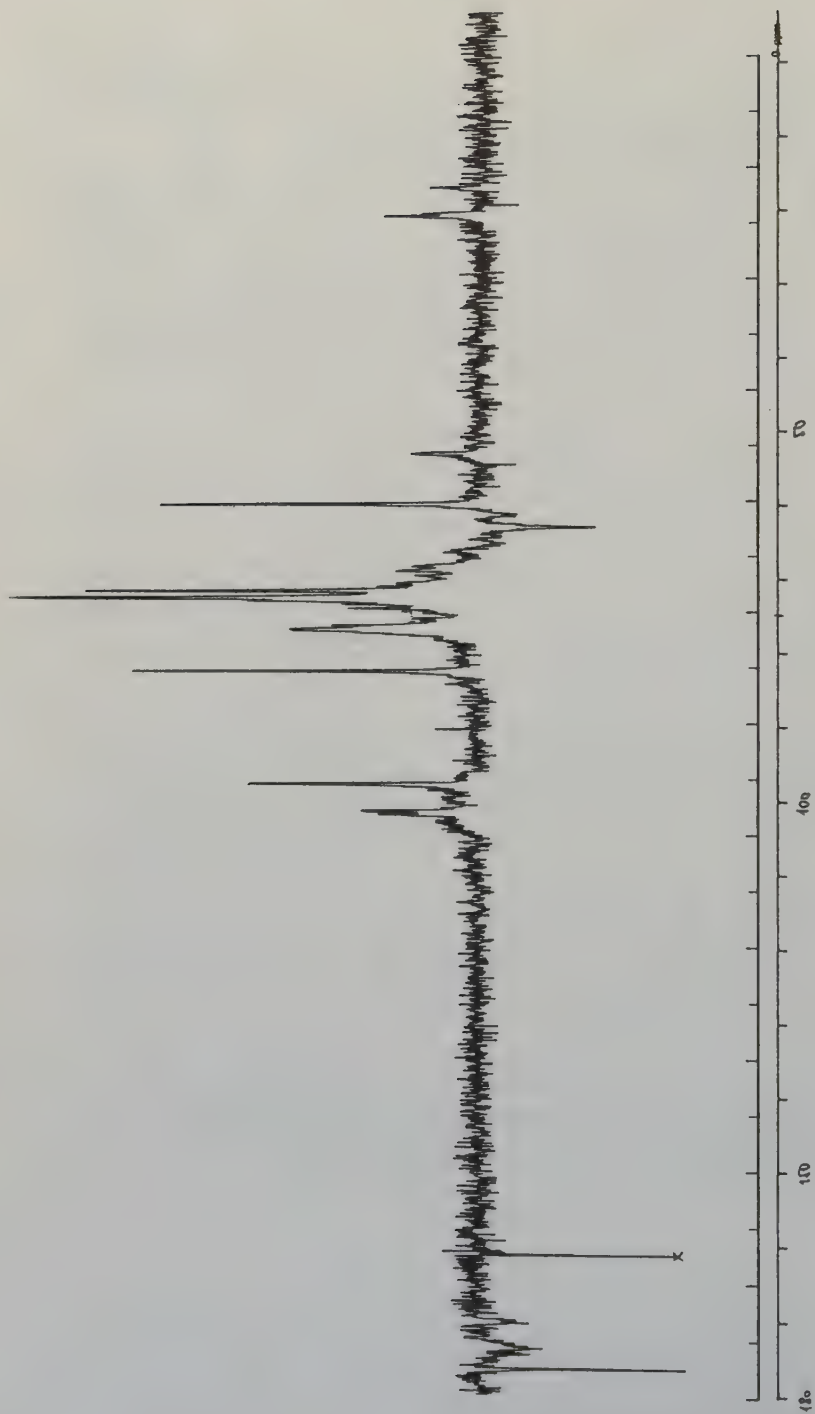


Abb. 9

^{13}C -NMR-Spektrum des Kamillenschleimpolysaccharids A (50.3 MHz)

Tabelle 8: Zuordnung der Signale aus dem ^{13}C -NMR-Spektrum
anhand von Vergleichssubstanzen

1- 4-O-Methyl- α -D-GluA (1 $\rightarrow$ _p)

	Kamillen- polysaccharid	Literaturangaben nach		SHIMIZU(88)
		SHASHKOV(89)	KOVAC(90)	
C-1	97.5 ppm	98.35 ppm	98.0 ppm	98.6 ppm
C-2	71.24		72.2	71.9
C-3	72.6		73.4	72.9
C-4	82.20		82.9	82.6
C-5	72.15		70.8	71.9
C-6, freie Säure	176.4		174.4	175.1
Me-O-4	59.5	60.5	61.3	
veresterte Säure	171.0	170.3		
Me-O-6	53.0	52.6		

2- Xylotriose, $\rightarrow$ 4) β -D-Xyl_p (1 $\rightarrow$)

	Kamillen- Polysaccharid	Literaturangaben nach KOVAC(93)
C-1	101.3 ppm	103.0 ppm
C-2		74.1
C-3	73.6	75.0
C-4	76.7	77.7
C-5	62.7	64.3
Acetyl-	20.4	20.7

Die geringe Intensität könnte von einer in der Seitenkette lokalisierten Glucuronsäure, die nur zu einem geringen Anteil verestert ist, oder von einer in der Hauptkette verknüpften Glucuronsäure stammen.

Wie die Methylierungsanalyse zeigte, ist ein hoher Anteil an Xylose 1,4-verknüpft und ca. 10% ist endständig. Nach Lage des anomeren Kohlenstoffatoms bei 101.3 ppm (92) handelt es sich um β -Xylose, die aufgrund der Zuordnung des Kohlenstoffatoms C-4 bei 76.7 ppm pyranosidische Struktur besitzen muß. Bei α -Isomerie wäre dieses Signal um einige δ -Werte nach höherem Feld verschoben gewesen (93).

Auch der hohe Drehwert von $+98^\circ$ spricht für β -Konfiguration, denn bei einer α -Verknüpfung müßte auch dieser Wert noch höher liegen (74).

Die Signale mit negativer Intensität können nur von Kohlenstoffatomen stammen, die zwei Protonen oder kein Proton tragen. Das Kohlenstoffatom C-5 bei 62.7 ppm mit negativer Intensität ist also ebenfalls ein Indiz für die pyranosidische Verknüpfungsweise der β -Xylosen (92). Das Signal bei $\delta=73.6$ ppm stammt von dem C-3.

Die Methylierungsanalyse zeigt für Xylose eine Verzweigung in C-2-Position an. Nur ein schwaches Signal bei 78.02 ppm deutet auf eine C-2-Verknüpfung mit der Glucuronsäure hin. Die freie Drehbarkeit scheint jedoch so behindert zu sein, daß dieses Kohlenstoffatom im ^{13}C -NMR nicht in Erscheinung tritt.

Das dritte anomere C-Atom mit Signal bei 101.7 ppm gehört ebenfalls zur Xylose, und zwar zu den Xylose-Endgruppen des offensichtlich stark verzweigten Kamillenpolysaccharids. KOVAC (92,93) stellte bei Xylanen zwischen Kettengliedern und nicht reduzierenden Endstücken Verschiebungen des anomeren Kohlenstoffs bis zu 0.6 ppm fest.

Bei 20.4 ppm erscheint eine Methylgruppe, die von einer teilweisen Acetylierung des Kamillenpolysaccharids stammt.

Im Protonenresonanzspektrum zeigt sich ein Signal bei 5.28 ppm im Bereich der α -anomeren Protonen. Dieses, wie auch alle anderen Signale sind sehr breit und schlecht aufgelöst. Das β -Proton der Xylose ist in diesem Spektrum nicht auszumachen. Das Signal bei 3.50 ppm gehört zur Methoxygruppe, während ein Signal bei 2.09 ppm auf eine teilweise Acetylierung des Polysaccharids hindeutet (siehe auch ^{13}C -NMR).

Das Kohlenstoffatom C-6 der Rhamnose ist aufgrund seiner großen Beweglichkeit bei $\delta = 18$ ppm (85) trotz seines geringen Anteils im gesamten Polysaccharid detektierbar.

Zusammenfassend ergibt sich somit:

Die schon aus der Totalhydrolyse bekannten Komponenten sind bestätigt: Xylose und Glucuronsäure. Die Xylose ist hochgradig verzweigt, die Glucuronsäure immer am C-4 methoxyliert und nur in einer einzigen Verknüpfung vorliegend: nicht reduzierend und endständig.

Die Methylierungsanalyse zeigt eine Verknüpfung über C-2, aber im ^{13}C -NMR ist weder eine Verzweigung über C-2 noch über C-3 sichtbar (82 bis 85 ppm).

Weiterhin kann man sagen, daß das Verhältnis Xyl/GluA annähernd 1:1 sein muß, wie auch schon aus der Totalhydrolyse ersichtlich. Zwar ist es beim breitbandentkoppelten Spektrum durch Integration der Signale nicht möglich, quantitative Vergleiche zwischen allen Kohlenstoffatomen zu ziehen, jedoch ist in diesem Fall ein Vergleich der anomeren Kohlenstoffatom-Signale durchaus möglich (94).

2.8. Enzymatischer Abbau mit β -Glucuronidase

Aus dem ^{13}C -NMR war ersichtlich, daß die Glucuronsäure ausschließlich α -verknüpft sein mußte. V.BRUCHHAUSEN hatte dagegen aus seinem Polysaccharid enzymatisch β -Glucuronsäure abspalten können. Wenn β -Glucuronsäure in geringem Maße im "backbone" vorhanden wäre, dürfte zumindest das anomere Kohlenstoffatom im ^{13}C -NMR nicht mehr sichtbar sein.

Trotz 24-stündiger Inkubation (156) des Kamillenschleim-polysaccharids mit β -Glucuronidase wurden weder Glucuronsäure noch Oligosaccharide freigesetzt, während V.BRUCHHAUSEN (16) bereits nach 5 Std. Glucuronsäure nachweisen konnte.

2.9. Partialhydrolyse

Aus Polysacchariden, deren glykosidische Bindungen in derselben Geschwindigkeit hydrolysiert werden, wie dies z.B. bei linearen Homopolymeren der Fall ist, erhält man in einer statistischen Verteilung verschieden strukturierte Oligosaccharide. Meistens werden die glykosidischen Bindungen jedoch mit unterschiedlicher Geschwindigkeit hydrolysiert. So sind z.B. Furanosezucker, wie die in Pflanzenpolysacchariden vorliegende Arabinose, empfindlicher als pyranosidische Bindungen, und α -verknüpfte Zucker werden leichter hydrolysiert als solche mit β -Verknüpfung. Die Aldobiuronsäuren bleiben unter Bedingungen, bei denen die Monozucker bereits abgebaut wurden, weitgehend intakt. Bei der Acetolyse werden bevorzugt nur die 1,6-Bindungen gelöst, während bei der wässrigen Hydrolyse zuerst die 1,4-, 1,2- oder 1,3-Bindungen gelöst werden (96,97). Bei Bakterienpolysacchariden konnte man durch diese Abbaumethoden auf die "repeating unit" schließen, während bei den komplex aufgebauten Pflanzenpolysacchariden eine ähnliche Regularität nicht existiert.

Da unser Kamillenpolysaccharid einen sehr hohen Uronsäuregehalt besitzt, mußten wir notwendigerweise sehr lange hydrolysieren.

Das Kamillenpolysaccharid wurde mit 0.05 N Trifluoressigsäure bei 95°C hydrolysiert und die Reaktion über DC verfolgt. Nach 2 Tagen waren erst ca. 50% des Polysaccharids hydrolysiert. Nach 8 Tagen konnten wir auf der DC im Laufmittelsystem Butanol-Methanol-Wasser (3:1:1) drei Hauptkomponenten nachweisen (siehe Abb. 10).

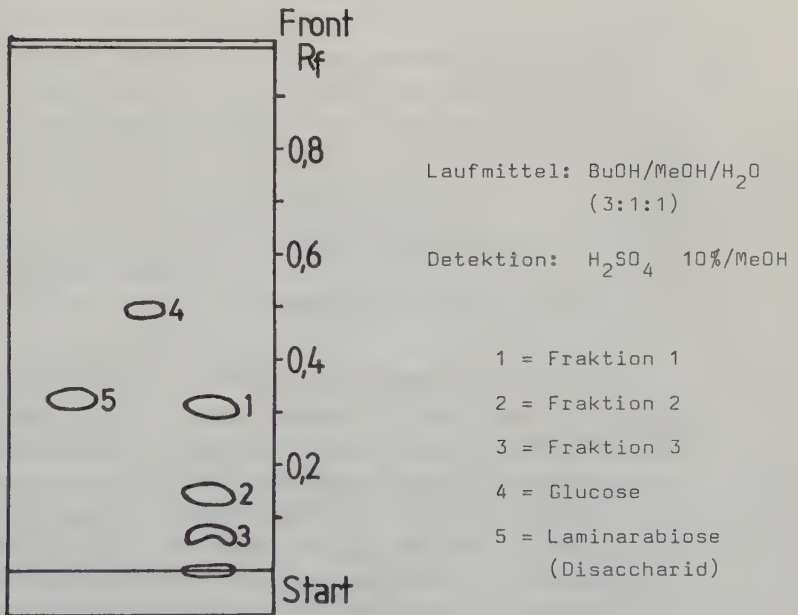


Abb. 10

DC der Partialhydrolyse

Nach dem DC-Bild handelte es sich bei den drei erhaltenen Fraktionen um Oligosaccharide. Wir konnten die 3 Abbauprodukte über eine Kieselgelsäule isolieren, erhielten aber nur geringe Ausbeuten (siehe Tabelle 9).

Die Hälfte der Oligosaccharide wurde für eine Säurehydrolyse mit 0.5 N Trifluoressigsäure und die Bestimmung der Zucker und Zuckersäuren im Biotronik ZA 5100 Zuckeranalysator eingesetzt. Für die Permethylierung, Reduktion, Remethylierung, Säurehydrolyse und Derivatisierung zu den partiell methylierten Alditolacetaten war die Menge zu gering.

Tabelle. 9: Zuckeranalyse der Bruchstücke

	Menge	R _f	Rha	Xyl	Glu	4-O-Me GluA
Fraktion 1	1 mg	0.31		+	+	+
Fraktion 2	2 mg	0.14	+	+		+
Fraktion 3	2 mg	0.07		+		

In allen drei Oligosacchariden fanden wir Xylose. Das größte Bruchstück (Fraktion 3), das den niedrigsten R_f-Wert hatte, bestand ausschließlich aus Xylose. In den beiden anderen Bruchstücken war auch die 4-O-Methyl-glucuronsäure nachweisbar, zusätzlich in sehr geringer Menge Rhamnose bzw. Glucose. Diese Zucker waren laut Hydrolyse in geringer Konzentration im Polysaccharid vorhanden, konnten jedoch in der Methylierungsanalyse nicht detektiert werden. Die Rhamnose war vorher bereits durch das charakteristische C-6-Signal im ¹³C-NMR-Spektrum identifiziert worden.

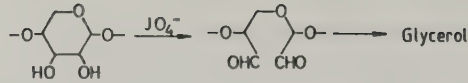
In einem weiteren Ansatz versuchten wir das Polysaccharid durch Acetolyse abzubauen. Das Polysaccharid wurde bei Zimmertemperatur mit einer Mischung aus Acetanhydrid und 0.1% Schwefelsäure-Zusatz, deren Konzentration dann bis auf 10% erhöht wurde, hydrolysiert. In keinem Fall war jedoch eine Abspaltung von Bruchstücken nachweisbar.

Aus diesem Ergebnis konnte man schließen, daß keine 1,6-Bindungen im Kamillenschleimpolysaccharid vorhanden waren, was auch mit dem Methylierungsergebnis übereinstimmte.

2.10. Periodatoxidation

Für die oxidative Glykolspaltung von Polysacchariden wird als Oxidationsmittel entweder Bleiacetat oder Periodat verwendet. Da Periodat auch in wässrigen Milieu verwendet werden kann, ist es das bevorzugteste Oxidationsmittel. Die am häufigsten angewendete Methode der Periodatoxidation besteht darin, den resultierenden Polyaldehyd mit NaBH_4 zu einem Polyalkohol zu reduzieren und dann den Polyalkohol zu hydrolysieren, wodurch reduzierende Zucker, Glycerin, Ethandiol und Tetritole freigesetzt werden (siehe Abb. 11).

1,4-verknüpfte
Kettenglieder



1,3-verknüpfte
Kettenglieder



Endgruppen

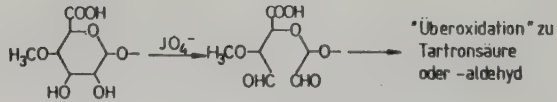
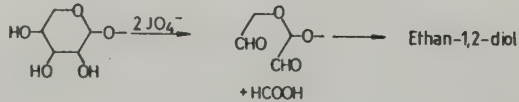


Abb. 11

Abbauprodukte aus der Periodatoxidation

Bei Oligosacchariden erfolgt der Abbau in den meisten Fällen quantitativ, wobei der Verlauf der Spaltung von 1,2-Diol- oder 1,2,3-Triol-Gruppen titrimetrisch (Ameisensäure) oder spektrophotometrisch (Formaldehyd) verfolgt werden kann. Die Zucker, die wegen Verzweigung keine freien Diolgruppen besitzen, werden nach der Hydrolyse auch als solche freigesetzt (98).

Die Interpretation der Ergebnisse kann jedoch durch Überoxidation oder unvollständige Oxidation, bedingt durch eine besondere sterische Anordnung der Hydroxylgruppen im Polysaccharid erschwert werden.

Bei einer Überoxidation können z.B. endständige Hexuronsäuren zu Tartrondialdehyd oder Tartronsäurealdehyd oxidiert werden, die nach Reduktion und Acetylierung als Glycerolacetat nachweisbar sind. Außerdem können sich zwischen Aldehyden und noch nicht oxidierten Hydroxylgruppen inter- und intramolekulare Halbacetale bilden, wodurch dann die weitere Oxidation behindert wird. Eine derartige Nebenreaktion findet besonders bei 1,4-verknüpften pyranosidisch vorliegenden Polysacchariden statt (92,103).

Die Reaktion wird bei einem pH von 3 bis 5 mit 0.01 bis 0.1 M NaIO_4 und bei niedriger Temperatur durchgeführt, um die Hydrolyse eventuell entstandener Acetale, die Oxidation von Zwischenprodukten und die Formiatester-Bildung zu hemmen. Die in Wasser instabilen Polyaldehyde werden anschließend zu Alkoholen reduziert, hydrolysiert und zu Alditolacetaten derivatisiert (99).

Beim Smith-Abbau hydrolysiert man bei Raumtemperatur mit verdünnter Säure, um größere Bruchstücke zu erhalten, da die nicht cyclischen Acetale säureempfindlicher als die cyclischen Acetale sind.

Der Anteil an Glycerol und Tetritol kann nur von endständigen Zuckern abstammen. Ihre quantitative Bestimmung ist eine alternative Methode zur Bestimmung der mittleren Kettenlänge des Polysaccharids.

Das Kamillenpolysaccharid wurde 7 Tage lang mit 0.05 M NaIO_4 (99) im Dunkeln oxidiert, die Spaltprodukte reduziert, mit 0.5 N Trifluoressigsäure hydrolysiert und anschließend peracetyliert.

Die Bestimmung des Xyloseanteils bei den Alditolacetaten ergab eine starke Abnahme der Xylose: das Verhältnis Xylose/Glucose, das bei der einfachen Zuckerhydrolyse noch 20:1 gewesen war, betrug nach der Periodatoxidation 1:1. Jedoch wäre aufgrund des Ergebnisses aus der Methylierungsanalyse ein höherer Rest an Xylose nach der Periodatoxidation zu erwarten gewesen. Dies läßt sich dadurch erklären, daß die Xylose mit der 4-O-Methylglucuronsäure verknüpft ist und deshalb nicht erfaßt werden konnte, weil sich stabile Xylobiuronsäuren gebildet haben, die im GC/MS nicht erfaßt wurden.

Der hohe verbleibende Anteil an Glucose legt die Vermutung nahe, daß die Glucose entweder 1,3-verknüpft oder als Verzweigungspunkt vorliegt. In dieser Form wurde sie aber in keiner der Methylierungsanalysen vorgefunden.

Als weitere Abbauprodukte wurden außerdem im GC/MS noch Glycerolacetat und zwei peracetylierte Tetritole detektiert.

Die Arabinose, die laut Permethylierungsanalyse nur endständig vorkommt, wurde erwartungsgemäß vollständig abgebaut.

Tabelle 10: Periodatabbau: Alditolacetate aus der GC/MS-Analyse

RT ²⁾ OV-1701	mol. Verh. 1)	Alditolacetate
0.47		Glycerol
0.95		Tetritol
1.0		Tetritol
1.42	-	Arabinitol
1.47	1	Xylitol
1.6	1	Glucitol

1) die molaren Verhältnisse wurden hier über ein Ionenchromatogramm berechnet.

2) bezogen auf 2,3,4,6-Tetra-O-methyl-
1,5-di-O-acetyl-glucitol

2.11. Alkalischer Abbau

Eine veresterte, in einem Polysaccharid gebundene Uronsäure, die gleichzeitig in C-1 und C-4 substituiert ist (z.B. nicht reduzierende, endständige 4-O-Methyl-glucuronsäure), kann in einem stark basischen Medium durch β -Eliminierung in eine ungesättigte Verbindung übergeführt und dann leicht an der glykosidischen Bindung gespalten werden (siehe Abb. 12).

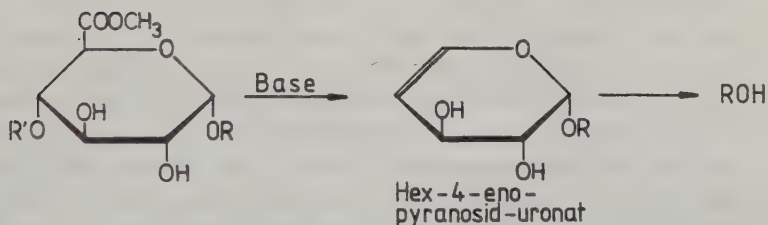


Abb. 12

Schema der β -Eliminierung

Beim basischen Abbau macht man sich diese Reaktion der Uronsäuren zunutze. Das Polysaccharid wird nach HAKOMORI (77) methyliert, um die Säure zu verestern und eine evtl. freie OH-Gruppe am C-4 der Uronsäure zu methylieren. Die anschließende Behandlung mit einer starken Base spaltet die Uronsäure ab. Die daraufhin freigewordenen OH-Gruppen der Neutralzucker an den Uronsäurebindungsstellen werden mit deuteriertem Methyljodid remethyliert, um sie dadurch von den anfangs methylierten Hydroxylgruppen unterscheiden zu können (100). LINDBERG (101) unterwirft das Polysaccharid im Anschluß an die zweite Basenbehandlung vor der zweiten Methylierung noch einer milden Säurehydrolyse, um die glykosidische Bindung am C-1 der

Uronsäure zu spalten. ASPINALL (102) zeigte jedoch, daß unter stark basischen Bedingungen, wie z.B. mit 1 M Dimsyl (Natrium-methylsulfinylmethanid) die Hexuronsäuren bereits völlig abgespalten werden, so daß man ohne Säurehydrolyse direkt methylieren kann.

Die Information, die aus dem basischen Abbau erhalten wird, kann verfälscht werden durch einen weitergehenden basischen Abbau der reduzierenden Zucker.

Wir methylierten das Kamillenpolysaccharid nach HAKOMORI, behandelten es anschließend 16 Stdn. lang mit 1 M Dimsyl und remethylierten dann mit Trideuteromethyliodid. Nach Entfernen des überschüssigen Methyliodid fügten wir dem Reaktionsgemisch Wasser zu, schüttelten mit Dichlormethan aus, um auch kleinere Bruchstücke mitzuerfassen, die entstehen können, wenn die Glucuronsäure in der Hauptkette gebunden ist und die bei der Dialyse verloren gehen. Das Gemisch der Dichlormethanausschüttelung wurde hydrolysiert und in üblicher Weise zu den Alditolacetaten derivatisiert. Die GC/MS-Analyse zeigte ein ähnliches Bild wie die Methylierungsanalyse. In keinem der partiell methylierten Alditolacetate war deuteriertes Methyliodid eingebaut worden, was darauf hindeutet, daß die vorhandenen Bruchstücke nicht mit einer Glucuronsäure verknüpft waren. Den Hauptpeak in der GC-Analyse bildet wiederum das von der 1,4-verknüpften Xylose stammende 2,3-Di-O-methylxylitol. Daneben findet man wieder das trimethylierte Xylitol vom nichtreduzierenden Ende und das monomethylierte Xylitol aus der Verzweigungsstelle. Es erscheint wieder das am C-2, C-3 und C-5 methylierte Arabinitol aus der Arabinose und zum ersten Mal ist die Rhamnose als 3,4-Di-O-methyl-rhamnitol, also 1,2-verknüpft, allerdings nur in geringer Menge nachweisbar.

Die molaren Verhältnisse haben sich jedoch gegenüber der Methylierungsanalyse verändert (siehe Tabelle 11, S. 55). Erfahrungsgemäß kann dies auf unterschiedliche Artefaktbildung

Tabelle 11: Basischer Abbau: partiell methylierte Alditolacetate aus der DCM-Phase

RT OV-1701 1)	molare Zusam.	Alditolacetate	Charakteristische Bruchstücke (m/e)
0.80	0.1	1,4-Di-O-acetyl-2,3,5-tri-O-methyl-arabinitol	43, 44, 117, 129, 45, 101, 87, 71
0.87	1	1,5-Di-O-acetyl-2,3,4-tri-O-methyl-xylitol	43, 117, 118, 101, 102, 161, 162, 44, 45, 87, 88, 58, 59
1.06	2	1,4,5-Tri-O-acetyl-2,3-di-O-methyl-xylitol	43, 118, 129, 87, 102, 189
1.21	1	1,2,4,5-Tetra-O-acetyl-3-O-methyl-xylitol	43, 118, 129, 130, 87, 88, 189, 190, 44
1.02	0.1	1,4,5-Tri-O-acetyl-3,4-di-O-methyl-rhamnitol	43, 131, 89, 130, 44, 190, 88

1) bezogen auf 1,5-Di-O-acetyl-2,3,4,6-tetra-O-methyl-glucitol

beim basischen Abbau zurückgeführt werden, so daß daraus keine Rückschlüsse auf die quantitative Verteilung gezogen werden können.

Zu erwähnen ist noch, daß bei der Permethylierung nach dem basischen Abbau nicht die in der einfachen Methylierungsanalyse vorgefundenen Derivate der Glucuronsäure gefunden wurden. Daher kann vermutet werden, daß Glucuronsäure abgespalten wurde, und dadurch der erhöhte Anteil an 1,4-verknüpfter Xylose im Vergleich zur Xylose, die über 1,2 und 4 verzweigt ist, erklärt wird.

Das obige Reaktionsgemisch wurde mit Dichlormethan ausgeschüttelt. Die wässrigen Phasen wurden vereinigt, zwei Tage lang gegen Leitungswasser, sodann gegen Aqua dest. dialysiert und der Rückstand gefriergetrocknet. Einen Teil dieses Rückstandes hydrolysierten wir mit Trifluoressigsäure und führten die Hydrolyseprodukte in die peracetylierten Alditolacetate über. Die andere Hälfte des Rückstandes remethylierten wir noch ein Mal (3.Methylierung) mit deuteriertem Methyljodid, hydrolysierten und bildeten die partiell methylierten Alditolacetate.

Die GC/MS-Analyse dieses wässrigen Rückstandes zeigte in beiden Fällen nur peracetylierte Alditolacetate. Neben den entsprechenden Derivaten von Xylose und Glucose traten auch jene von Arabinose, Galaktose und Mannose, allerdings nur in Spuren auf. Diese waren bei den bisherigen Analysen, außer bei der Totalhydrolyse, nicht erfaßt worden (siehe Tabelle 12, S. 57).

Tabelle 12: Alkalischer Abbau: Alditolacetate aus der wässrigen Phase

RT 1) OV-1701	molares Verhältnis	
1.42	-	Arabinose
1.47	1	Xylose
1.56	in Spuren	Mannose
1.58	in Spuren	Galaktose
1.60	22	Glucose

1) bezogen auf 2,3,4,6-Tetra-O-methyl-
1,5-di-O-acetyl-glucitol

Offensichtlich ließen sich diese Zuckerkomponenten nicht methylieren, was mit ihrer Lage im Polysaccharidmolekül zusammenhängen muß, denn aus der Literatur ist uns kein Beispiel für eine schwierigere Methylierbarkeit von Hexosen im Vergleich zu Pentosen bekannt. Auch bei der Remethylierung mit deuteriertem Methyljodid wurden im GC/MS keine partiell methylierten Alditolacetate, sondern nur peracetylierte Alditole gefunden.

3. Zusammenfassung der Strukturmerkmale

Aus den Analysenergebnissen lassen sich folgende Aussagen zur Struktur des isolierten Kamillenschleimpolysaccharids A machen:

Die beiden Hauptkomponenten sind die Xylose und die α -4-O-Methyl-glucuronsäure. Die Xylose liegt pyranosidisch vor und bildet mit einer 1,4 β -Verknüpfung die Hauptkette des Polysaccharids. Von der Hauptkette sind mehr als die Hälfte der Xylosen über C-2 verzweigt.

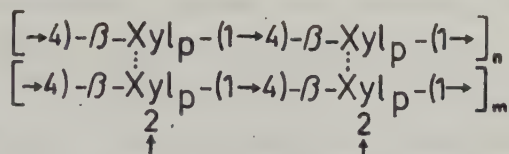
Die Glucuronsäure liegt ebenfalls pyranosidisch vor. Sie kommt nur endständig, nicht reduzierend und in α -Verknüpfung vor. Eine Verknüpfung der Glucuronsäure mit der Xylose über das C-2 der Xylose konnte nicht nachgewiesen werden - weder durch den basischen Abbau, noch das ^{13}C -NMR-Spektrum. Die bisher isolierten Glucuronoxylane, die als Hemicellulosen auch fast nur mit Alkali extrahiert werden, besitzen ausnahmslos negative Drehwerte, ganz im Gegensatz zu dem Kamillenpolysaccharid. V.BRUCHHAUSEN und JANECKE (16-24) hatten bereits den hohen Glucuronsäuregehalt festgestellt und in Erwägung gezogen, daß die Säure einen Teil der Hauptkette im Polysaccharid bildet. Dies konnte von uns aber eindeutig durch das ^{13}C -NMR-Spektrum widerlegt werden.

Die Version, die am ehesten mit den Analysendaten übereinstimmt ist die folgende: ein in jedem Glied mit einer Glucuronsäure substituiertes Xylan, an das ein Xylan entweder direkt über C-2 gebunden, oder derart assoziiert ist, daß es nicht vom substituierten Xylan abzutrennen ist. Letzteres würde den hohen Anteil an Kettengliedern erklären, der sonst mit dem hohen Anteil an endständiger Uronsäure nicht gedeutet werden kann.

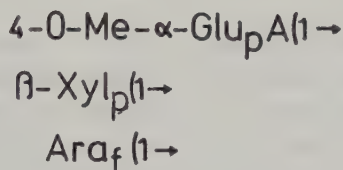
Die anderen Monosaccharide sind wie in anderen Xyloeschleimen auch in relativ geringen Mengen vorhanden: die Arabinose, furanosidisch, nicht reduzierend, endständig gebunden.

Nach den Analysenergebnissen ist auch ein geringer Anteil an 1,2-gebundener Rhamnose möglich. Das Ergebnis der Periodatoxidation läßt zusätzlich eine blockartige Verteilung der Seitenketten vermuten.

Hauptkette:



Seitenketten:



Aufgrund unserer Ergebnisse muß die von JANECKE und v.BRUCHHAUSEN vorgeschlagene Struktur (siehe S. 13) korrigiert werden. Die Unterschiede ergaben sich möglicherweise daraus, daß v.BRUCHHAUSEN zur Reinigung des Polysaccharids Säure und auch Ammoniak verwendete, während wir schonend mit Wasser extrahierten. Außerdem standen v.BRUCHHAUSEN noch nicht die modernen Methoden der GC/MS, NMR-Spektroskopie und der Gelchromatographie zur Verfügung, so daß auch die Reinheit der isolierten Polysaccharide damals nicht mit absoluter Sicherheit festgestellt werden konnte.

Mit diesen Strukturmerkmalen läßt sich der Kamillenschleim in die Klasse der Xyloglycan-Schleime einordnen, von denen im Vergleich zu anderen Schleimen und Gummien bisher nur wenige bekannt und in ihrer Struktur aufgeklärt worden sind.

Im Vergleich zu den strukturell bekannten Schleimxylanan ist der hohe Uronsäuregehalt im Kamillenpolysaccharid auffällig, der bisher in keinem dieser Schleimpolysaccharide gefunden worden ist. Ansonsten liegen die Unterschiede im Aufbau der Seitenketten, die neben Arabinose auch aus Glucose, Galaktose oder Galakturonsäure bestehen können.

Allen diesen Schleimen ist ein 1,4 β -Xylan-Grundgerüst gemeinsam.

Sapote gum (124) aus *Sapote achras*, ein Baum in Südamerika, hätte demnach eine dem Kamillenschleim ähnliche Zusammensetzung, nämlich Glucuronsäure, Xylose und Arabinose. Ein verzweigtes 1,4 β -Xylan ist hier in jeder Xylose über das C-2 mit Glucuronsäure oder 4-O-Methyl-glucuronsäure substituiert, die jedoch - im Gegensatz zum Kamillenpolysaccharid - wiederum über C-2 mit Xylose oder Arabinose verzweigt sein kann. Brea gum aus *Cercidium australe* (125), einem südamerikanischen Baum, hat auch eine sehr verwandte Struktur. Der Schleim aus *Plantago* spp. besteht ebenfalls aus einem Xylan-"backbone", wobei sich die verschiedenen Spezies durch die Seitenketten unterscheiden. Für *Plantago major* fand TOMODA (84) Seitenketten aus Galakturonsäure, Arabinose und endständiger Glucuronsäure (siehe auch S. 122). Bei *Plantago ovata* fanden SANDHU und Mitarb. (126) wie beim Kamillenschleim auch Rhamnose, aber keine Glucuronsäure. Dies verbindet ihn wiederum mit der Struktur des Schleims aus *Ocimum basilicum* (127).

Aus *Cinnamomum zeylanicum* und *C. iners* (128) wurde jeweils ein neutraler Xylanschleim isoliert, mehr ein Arabinoxylan, mit einem Arabinose/Xylose-Verhältnis 1.5:1, wobei die Xylose-Hauptkette über C-2 und C-3 verzweigt ist. Als ein neutrales Arabinoxylan wurde auch der Leinsamenschleim (129) identifiziert. Ebenfalls aus einem neutralen, linearen Polysaccharid besteht der *Watsonia*-Gummi aus *Watsonia pyramidata* (130), das Seitenketten aus Arabinose und Galaktose enthält.

4. Kreuzreaktion des Kamillen-Polysaccharides und anderer

Polysaccharide mit Pneumokokken-Antiseren

HEIDELBERGER (104) fand erstmals, daß bestimmte Pneumokokken-Antiseren mit verschiedenen Gummen und Pflanzenpolysacchariden Kreuzreaktionen geben, so daß angenommen werden konnte, daß zwischen bestimmten Pneumokokken-Zellwandpolysacchariden und den positiv reagierenden Pflanzen-Polysacchariden strukturelle Ähnlichkeiten bestehen. HEIDELBERGER glaubte, daß hiermit ein Beitrag zur Klassifizierung von pflanzlichen Zuckerpolymeren möglich sei.

Seine Vermutungen wurden bestätigt durch die Fortschritte der Polysaccharid-Chemie, die zu einer immer größeren Zahl von aufgeklärten Pneumokokken-Polysacchariden führte.

Die Antigen-Antikörper-Reaktion ist eine bekannte fundamentale Reaktion zur Abwehr eingedrungener pathogener Infektionskeime.

Wenn ein lösliches Antigen mit einem Serum gemischt wird, das spezifische Antikörper enthält, entsteht eine Präzipitation, die sog. Immunpräzipitation. HEIDELBERGER nutzte diese Reaktion schon im Jahre 1929 zur quantitativen Bestimmung des Antikörpergehalts im Serum aus, indem er den Stickstoffgehalt im Präzipitat bestimmte.

UDIN (107) verbesserte diese Methode durch die "single diffusion technique": das Antigen diffundiert in ein Agarosegel, das Antiserum enthält. Wenn das Antigen in das Gel diffundiert, bildet sich eine opake, wandernde Präzipitationslinie an der Stelle, wo das optimale Verhältnis Antigen/Antikörper besteht.

OUCHTERLONY (108) änderte die Methode dahingehend ab, daß er auf Agarosegel von der einen Seite das Antigen und von der anderen Seite den Antikörper gegeneinander diffundieren läßt. Diese Methode verwendeten wir auch in unseren Versuchen.

Pneumokokken-Antiseren besitzen Antikörper, die sich gegen kapsuläre oder somatische O-Polysaccharide der Pneumokokkenmembranen richten. Entsprechend der Anzahl Antigen/Antikörperpaare können sich bei einem solchen Diffusionsversuch auch mehrere Präzipitationsbanden bilden. Aufgrund von strukturellen Übereinstimmungen präzipitieren diese Antiseren jedoch auch Polysaccharide, die dieselbe Spezifität aufweisen, obwohl sie anderen Ursprung haben.

Die strukturelle Spezifität allein ist allerdings für eine Präzipitationsreaktion nicht ausreichend. Eine zweite wichtige Bedingung ist, daß Antigen und Antikörper multivalent, mindestens jedoch bivalent sind, damit sie vernetzen, d.h. aggregieren können. Diese Aggregation wird als Präzipitat sichtbar. Bei der Aggregatbildung geht durch Entladung einer großen Anzahl von positiven und negativen Ladungen die Affinität bzw. die Löslichkeit verloren, so daß es zur Ausfällung kommt. Als weitere Parameter für die Komplexbildung wären noch zu nennen: Konzentration der jeweiligen Partner, die Antigen-Bindungskapazität, bzw. -Präzipitationskapazität, die Affinität und die Avidität (109).

Unser Ziel war es, einerseits Bestätigung für die bereits gefundenen Strukturmerkmale des Kamillenpolysaccharids zu bekommen und andererseits aus diesem Ergebnis eventuelle Analogien zu anderen Schleimpolysacchariden zu finden. Dabei konnten wir uns einerseits auf die Arbeiten von HEIDELBERGER (104,105) stützen, der bereits Kreuzreaktions-Experimente zwischen Pflanzenpolysacchariden, insbesondere Gummen, und Anti-Pneumokokken-Seren ausgeführt hatte, und andererseits auf eine Übersichtsarbeit von LARM und LINDBERG (110), in der die Strukturmerkmale von 25 der ungefähr 80 kapsulären Pneumokokken-Polysaccharide aufgelistet sind.

Für die Diffusionsversuche standen uns Rohschleime zur Verfügung und teilweise auch reine Komponenten aus diesen Schleimen. Es handelte sich dabei um Schleime, die in unserem Arbeitskreis aus *Orchis militaris* (Salep Tuber), *Farfarae* Fol., *Althaeae* Rad., *Psyllii* Semen, *Foenugraeci* Semen, *Lini* Semen und *Cydoniae* Semen isoliert worden waren. Außerdem standen uns Polysaccharidfraktionen aus *Sabal serrulata*, *Carthamus tinctorius*, *Tilia argentea* und *Hibiscus sabdariffa* (Tab.14, S. 68) und chemisch definierte, einheitliche Polysaccharide aus *Althaea officinalis*, *Plantago major* var. *asiatica* und aus *Hibiscus manihot* (= *Abelmoschus manihot*) (Tabelle 15, S. 69) aus anderen Arbeitskreisen zur Verfügung.

In die Untersuchungen wurden auch im Handel befindliche Gummien, die laut HEIDELBERGER Kreuzreaktionen zeigen sollten, mit-einbezogen (Tab. 16, S. 70). Als Antiseren standen uns die kommerziell zu diagnostischen Zwecken hergestellten Kaninchen-Anti-Pn-Seren und ein Pferdeantiserum Typ 2 zur Verfügung. Die Spezifitäten sind in Tab. 13, S. 67, aufgezichnet.

In der Literatur werden bei Kreuzreaktionen mit Polysacchariden und Pneumokokkenserum meist Pferdeseren, gelegentlich auch Kaninchenserum verwendet. CALDES (113) hatte bei Versuchen mit gegen Typ 3 gerichteten Antiseren festgestellt, daß nur das Pferdeserum in den gegebenen Konzentrationen reagierte. HEIDELBERGER (114) fand in einem Fall, daß bei Typ 2 nur das Pferdeserum reagierte.

Der Antikörpertiter der beiden Antiseren von Pferd und Kaninchen konnte nicht verglichen werden, da in letzterem Fall nur die Verdünnungsreihe, beim Pferdeserum nur Stickstoffgehalt angegeben war. Als Diffusionsmilieu verwendeten wir 1%ige Agarose, die mit Phosphatpuffer auf pH 7.4 eingestellt war und 1% NaCl enthielt. Die in dieses Gel gestanzten Löcher konnten jeweils 10 µl Antiserum bzw. Polysaccharidlösung aufnehmen. Die Konzentrationen der Polysaccharide waren zwischen 1 und 5 mg/ml. Um die Konzentration der beiden Reaktionspartner zu erhöhen, wurden diese Löcher in drei- oder mehrstündigen Abständen wieder aufgefüllt, sobald die vorherige Lösung herausdiffundiert war. Die Temperatur spielte bei unseren Versuchen keine wesentliche Rolle. Wir stellten zwar fest, daß die Diffusion bei Kühlschranktemperatur etwas länger dauerte, aber die Präzipitationslinie war gleich gut sichtbar, wie bei einer bei Raumtemperatur ausgeführten Diffusion.

Mit den kommerziell hergestellten Kaninchenserum konnten wir nur in einem Fall eine schwache Reaktion beobachten, nämlich zwischen Typ 2 und einem Glucuronoxylan aus *Eupatorium*. Diese Reaktion war jedoch ausgeprägter bei Verwendung von Pferdeserum, so daß wir für die folgenden Versuche nur noch dieses verwendeten. Pferdeantiserum Typ 2 ist spezifisch für die in Tab. 13, S.67, angegebene Sequenz, insbesondere für die endständige, nicht reduzierende Glucuronsäure, die auch in C-4 methoxyliert sein kann.

Für den Kamillenschleim und für den von *Sabal serrulata* konnten wir bereits in einer Rohfraktion eine positive Reaktion, also das Vorhandensein einer endständigen α -Glucuronsäure nachweisen. Eine sehr schwach positive Reaktion zeigte auch ein mit Wasser hergestelltes Roh-Polysaccharid aus *Carthamus tinctorius*, während das mit wässrigem Alkali gewonnene Rohpolysaccharid keine Reaktion zeigte. Bei der Auftrennung der positiv reagierenden Rohschleime aus *Sabal* und *Matricaria*, und der Schleime, die nur wenig Glucuronsäure enthielten, konnten wir dann besser differenzieren. Das Kamillenschleimpolysaccharid A zeigte schon eine positive Reaktion bei geringer Konzentration (bei 0.05 mg im Gegensatz zu 0.15 mg beim Rohprodukt). Bei der weiteren Auftrennung des *Sabal*-Polysaccharids konzentrierte sich das Uronsäurevorkommen auf zwei Fraktionen. Ebenfalls positiv reagierte die gereinigte Form des uronsäurehaltigen *Plantago*-schleimes. Erwartungsgemäß positiv verlief die Reaktion mit einem hoch- und einem niedermolekularen Glucuronoxylan aus *Eupatorium perfoliatum*.

Nur bei dem Kamillenschleimpolysaccharid konnte durch Verminderung der Konzentration von 0.050 auf 0.030 mg die Empfindlichkeit der Reaktion durch Verwendung von reinem statt 1:1 verdünntem Antiserum erhöht werden.

Bei allen positiv reagierenden Polysacchariden waren die Reaktionen durch Zugabe von Glucuronsäure hemmbar.

Das Kamillenpolysaccharid A wurde zusätzlich in einem grösserem Ansatz im Reagenzglas auf Anti-Pneumokokken-Serum Typ 5 vom Pferd getestet (123). Dieses Serum ist ebenfalls für endständige, nicht-reduzierende und nicht am C-4 methylierte Glucuronsäure spezifisch. Es entstand eine schwache Präzipitation, die deutlich schwächer war als mit Typ 2. Das Anti-Pneumokokken-Serum Typ 2 unterscheidet nicht, ob C-4 der Glucuronsäure methyliert ist oder nicht. Es reagiert jedoch nicht, wenn die Glucuronsäure am C-2 oder C-3 methyliert ist.

Kamillenpolysaccharid A reagierte im Gegensatz zu den Hemicellulosen aus *Eupatorium perfoliatum* nicht mit dem Kaninchen-Antiserum Typ 2. Dies war insofern überraschend, als laut Zuckerhydrolyse der Glucuronsäuregehalt im Kamillenschleim mindestens dreimal so hoch ist wie in den beiden Hemicellulosen. Es wäre denkbar, daß dieses Ergebnis mit der Tertiärstruktur der beiden Polysaccharide zusammenhängt, bzw. mit dem Verzweigungsgrad, der bei dem Kamillenpolysaccharid höher ist, als bei den *Eupatorium*-Polysacchariden.

Bei allen Polysacchariden, die in unseren Diffusionsversuchen keine Präzipitationslinien ergaben, einschließlich der Gumen und Pflanzenpolysaccharide, die bei den von HEIDELBERGER vorgenommenen Kreuzreaktionen positiv reagierten, lag die Glucuronsäure zwar endständig, aber in β -glykosidischer Verknüpfung vor. Daraus kann man eine eindeutige "Bevorzugung" der α -verknüpften Glucuronsäure für die Präzipitationsreaktion mit Antipneumokokkenserum vom Typ 2 ableiten, die erst durch eine Erhöhung der Konzentration des Polysaccharidpartners aufgehoben wird. HEIDELBERGER verwendete bei seinen Versuchen eine Polysaccharidkonzentration von 0,5 bis 2 mg mit 1 ml und mehr Antiserum.

Damit scheint bewiesen, daß die Diffusionsmethode in der Lage ist, endständige, nicht reduzierende 4-O-Methyl- α -glucuronsäure auch in einer geringen Menge Polysaccharid aufzufinden.

Eine weitere Bedeutung dieser Befunde liegt darin, daß möglicherweise in Zukunft derartige Polysaccharide anstelle von Pneumokokken-Antiseren als Vaccine eingesetzt werden können, worauf schon CALDES (133) hingewiesen hatte.

Tabelle 13: Spezifität der Anti-Pneumokokken-Sera
(kapsuläre Polysaccharide)

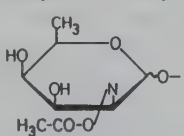
	<u>Literatur</u>
<u>Typ 1:</u> D-Glucose 2-Amino-2-deoxy-D-glucose 2-Amino-2-deoxy-D-galaktose <u>D-Galakturonsäure</u>	(120)
<u>Typ 2:</u> $+3) \alpha \text{LRha}_p (1 \rightarrow 3) \alpha \text{LRha}_p (1 \rightarrow 3, 4) \beta \text{LRha}_p (1 \rightarrow 4) \alpha \text{DGlu}_p (1 \rightarrow 2) \uparrow 1 \alpha \text{DGlu}_p (1 \rightarrow 6) \uparrow 1 \alpha \text{DGluA}_p$	(120)
<u>Typ 3:</u> $+3) \beta \text{-GluA} (1 \rightarrow 4) \beta \text{-Glu} (1 \rightarrow 4) \text{Cellobiuronsäure}$	(122)
<u>Typ 5:</u> $+2) \text{D-GluA} (1 \rightarrow 3) \text{L-FucNAc}_p (1 \rightarrow 4) \uparrow 1 \text{DGlu}_p (1 \rightarrow 4) \uparrow 1 \text{L-PneNAc}_p$ L-PneNAc: N-Acetyl-L-pneumosamine oder 2-Acetamido-2,6-dideoxy-L-talosyl 	(121)
<u>Typ 8:</u> $+4) \beta \text{-GluA} (1 \rightarrow 4) \beta \text{-Glu} (1 \rightarrow 4) \alpha \text{-Glu} (1 \rightarrow 4) \alpha \text{-Gal}$	(122)

Tabelle 14: Testungen mit Pneumokokken-Antiserum Typ 2 (Pferd)

<u>Rohfraktionen:</u>	Reaktion	eingesetzte Substanzmenge
Chamomilla recutita, Flos, Asteraceae	+	0.150 mg
Orchis militaris, Tuber Salep Archidaceae	-	>1.5 mg
Tussilago farfara, Folium, Asteraceae	-	>1.3 mg
Althaea officinalis, Radix, Malvaceae	-	>1.35 mg
Plantago psyllium, Semen, Plantaginaceae	-	>1.4 mg
Trigonella foenum-graecum, Semen, Fabaceae	-	>0.52 mg
Cydonia oblonga, Semen, Rosaceae	-	>0.52 mg
Linum usitatissimum, Semen, Linaceae	-	>1.35 mg
Sabal serrulata, Fructus, Arecaceae	+	0.290 mg
Tilia argentea, Flos, Tiliaceae	-	0.180 mg
Hibiscus sabdariffa, Flos, Malvaceae		
- "neutraler Extrakt"	-	0.325 mg
- "bas. Extrakt"	-	0.080 mg
Carthamus tinct. Flos, Asteraceae		
- "neutraler Extrakt"	+	>0.335 mg
- "basischer Extrakt"	-	>0.450 mg

Tabelle 15: Kreuzreaktionen mit Pneumokokken-Antiserum Typ 2
(Pferd)

Kreuzreaktion ²⁾	Mindest- menge	Uron- säuren	Zuckerkomponenten	Lit.
Gummi arabicum	-	α DGluA GalA	<u>Rha</u> , Ara, Glu	(105)
Sabal serrulata				
-Polys.-frakt.1	+ 180 μ g		Ara, Xyl	(115)
-Polys.-frakt.2	+ 290 μ g		Galaktan, Ara/Xyl	
-Polys.-frakt.3	-			
Eupatorium perfoliatum				(81)
-Hemicell. A	+ 100 μ g	Me α DGluA	Xyl, Ara (MG 2 Mill.)	
-Hemicell. B	+ 120 μ g	Me α DGluA	Xyl, Ara	
Tilia argentea				(118)
-Polys.-frakt.1	- 60 μ g	10%	Ara, Gal, (Rha, Fuc, Xyl, Ma, Glu)	
-Polys.-frakt.2	+ 100 μ g	63%	Rha, Gal, (Ara, Xyl, Man, Glu)	
Althaea off. -Schleim OL	- 300 μ g	β GluA α DGalA	Rha	(45)
Althaea off. -Schleim O	- 300 μ g	β GluA β DGalA	Rha, Gal	(111)
Kamillenschleim polysaccharid A	+ 30 μ g ¹⁾ 50 μ g	Me α DGluA	Xyl, Gal, Ara	
Plantago major -Schleim A	+ 70 μ g	Me α DGluA α DGalA	Xyl, Ara	(84)
Abelmoschus esculentus -Okra-Schleim	- 300 μ g	α DGalA	Rha	(119)
Abelmoschus manihot, -Schleim M	- 300 μ g	β GluA α DGalA	Rha	(112)

1) mit reinem Antiserum

2) mit verdünnt. Antiserum 1:1

Tabelle 16: Kreuzreaktionen von Pflanzenpolysacchariden
mit Pneumokokken-Anti-Sera nach HEIDELBERGER (104, 105)

- Typ 1: *Althaea armeniaca* (Wurzel)
 Althaea officinalis (Wurzel)
 Linum usitatissimum (Samen)
 Sterculia urens (Karaya Gummi)
 u.a.
- Typ 2: *Althaea armeniaca* (Wurzel)
 Althaea officinalis (Wurzel)
 Linum usitatissimum (Samen)
 Acacia senegal (arabischer Gummi)
 Sterculia urens (Karaya Gummi)
 u.a.

Typ 8 und Typ 3:

- Sterculia urens* (Karaya Gummi)
 Dextran N236
 β -Glykane (i.a. keine Dextrane, da α)
 u.a.
-

D. P H A R M A K O L O G I S C H E R T E I L

1. Testung auf antiphlogistische Wirkung

Bisher wurde die antiphlogistische Wirkung der Kamille allein den Bisabololen und dem Chamazulen des eth. Öles zugeschrieben. Nachdem in einer früheren Arbeit aus unserem Arbeitskreis ein antiphlogistisch wirkendes Polysaccharid aus *Sabal serrulata* (37) isoliert worden war und es in der Literatur mehrere Hinweise in dieser Richtung gibt (36,38), prüften wir die Rohfraktion des Kamillenschleims in verschiedenen Testmodellen auf antiphlogistische Wirkung.

Außerdem wurden auch noch die Polysaccharidfraktionen der als Antiphlogistika bekannten Drogen *Calendula officinalis* und *Arnica montana*, die wie die Kamille zu der Familie der Asteraceen gehören, untersucht.

Verwendung fanden der Viscarin-Carrageenin-Test, der Granulombeutel-Test der Kunststoffpellet-Test und der Erythem-Test. Während der Viscarin-Carrageenin- und der Erythem-Test die antiexsudative Wirkung erfaßt, kann mit dem Kunststoffpellet- und Granulombeuteltest auf die eigentliche antiphlogistische Wirkung geprüft werden.

Wie aus Tabelle 17, S. 73, ersichtlich, besitzt der Kamillenschleim am Viscarin-Carrageenin-Ödem und im Kunststoffpellet-Test bei einer Konzentration von 10 mg/kg eine sehr gute Hemmwirkung. Dagegen konnte im Granulombeutel- und Erythem-Test des Meerschweinchens eine nur angedeutete Wirksamkeit nachgewiesen werden. Bei den Arnika-Polysacchariden waren die Befunde ähnlich: schon bei 1 mg/kg war am Carrageenin-Rattenpfotenödem ein ausgeprägter Hemmeffekt zu beobachten. Am UV-Erythem trat zu Beginn ebenfalls eine Hemmung auf (10 bis 15%),

die sich aber während der weiteren Beobachtungszeit noch verringerte.

Das Calendula-Polysaccharid wurde nur am Carrageenin-Rattenpfoten-Test getestet. Die hier erforderlichen hohen Dosen (25 mg/kg) sprechen für eine nur geringe antiphlogistische Wirksamkeit.

Die geringe Wirksamkeit des Kamillenschleims im Granulombeuteltest ist nicht verwunderlich, da eine Proliferationshemmung des Bindegewebes bisher nur bei steroidhaltigen Antiphlogistika beobachtet werden konnte. Dieses nahezu Fehlen der Wirkung bei den Kamillepolysacchariden und die schwache Wirkung bei den Arnica-Polysacchariden steht allerdings im Gegensatz zu den guten klinischen Erfolgen bei Hautentzündungen.

Tabelle 17: Ergebnisse der antiphlogistischen Untersuchungen

Testanordnung	Konzentration	Kamille	Arnica	Calendula
Viscarin-Carrageenin- Ödem	1 mg/kg/5 ml	63% nach 3h	64% nach 3h	-
		8% nach 23h	57% nach 5h	
			3% nach 23h	7% nach 24h
	10 mg/kg/5 ml	76% nach 3h		25% nach 3h
		5% nach 23h		21% nach 5h
	25 mg/kg/5 ml			18% nach 24h
Kunststoffpellet- Test	10 mg/kg/5 ml			52% nach 3h
		57% nach 2h		37% nach 5h
				26% nach 24h
UV-Erythem	10 mg in			
	1%iger Salbe	4.5%	5.5%	

2. Immunologische Untersuchungen

2.1. Granulozytentest

Die Steigerung der Phagozytose der Granulozyten wurde in Konzentrationsbereichen von 0.1 bis 0.001% getestet, da sie in diesem Bereich erfahrungsgemäß ihre stärkste stimulierende Wirkung entfalten.

Eine Rohpolysaccharidfraktion aus der Kamille zeigte eine Phagozytosesteigerungsrate von 31% bei einer Konzentration von 0.01%.

Die gemessenen Steigerungen von 25 bis 30% bei den Polysaccharid-Rohfraktionen (siehe Tab. 18, S. 78) sind noch signifikant. Dabei ist besonders hervorzuheben, daß die getesteten Fraktionen aus *Eleutherococcus senticosus* (117) und aus *Arnica montana* die hohen Steigerungsraten von 52% (bei Konz. 0.01%) bzw. 44% (bei Konz. 0.001%) zeigten.

Geringe Wirkungen zeigten die getesteten Gummien (siehe Tab. 20, S. 80): nur eine Phagozytosesteigerung bis max. 15% bei unterschiedlichen Konzentrationen. Nur bei der Gummie aus *Araucaria bidwillii*, deren Uronsäuren reduziert worden waren, erhielten wir mit einer ca. 30%igen Steigerung bei 0.01%iger Konzentration ein gutes Ergebnis.

Deutlicher fielen die Ergebnisse bei den chemisch genauer definierten Polysacchariden aus. Das Kamillenpolysaccharid A zeigt bei einer Konzentration von 0.01% eine Steigerungsrate von ca. 58%. Einen noch höheren Wert liefert das Schleimpolysaccharid aus den *Althaea*-Wurzeln, während das Schleimpolysaccharid aus den Blättern geringere Wirkung zeigt. Beide Polysaccharide besitzen zwar eine gleich zusammengesetzte Hauptkette (siehe Anhang, S. 123), unterscheiden sich jedoch in

den Seitenketten. Sie besteht bei dem Blätterpolysaccharid (45) nur aus Glucuronsäure, während das Wurzelpolysaccharid noch zusätzlich Seitenketten aus zwei Galaktoseeinheiten besitzt, so daß jedes Monosaccharid der Hauptkette verzweigt ist (44).

Der Plantagoschleim besitzt wie das Kamillenpolysaccharid eine Hauptkette aus 1,4-verknüpfter Xylose (84), jedoch relativ wenig Verzweigungspunkte. Diese Linearität könnte der Grund für die relativ geringe Phagozytosesteigerung von nur 20% bei der Konzentration von 0.01% sein. Interessanterweise besitzen die Xylane von *Larix* spp. und *Glycine max* keinerlei Wirkung. Im Unterschied zu den Xylose-Schleimpolysacchariden enthalten sie keine oder nur geringe Säureanteile in ihren Molekülen.

Ein 1,4 β -verknüpftes Xylan aus *Sabal serrulata*, dessen Rohfraktion schon gute Wirksamkeit gezeigt hatte, wies eine Steigerungsrate von 32% auf (114). Es unterscheidet sich von den zuvor erwähnten Xylanen durch den hohen Gehalt an Arabinose, die 1,5-verknüpft in den Seitenketten vorkommt.

Aus *Echinacea purpurea* konnten zwei chemisch definierte Polysaccharide isoliert werden, von denen das eine ein 1,4 β -Xylan darstellt, in dem jede fünfte Xylose einen Verzweigungspunkt für die Seitenketten bildet. Dieses Polysaccharid erreichte eine Phagozytosesteigerung von 15% bei 0.01% (132). In diesem Fall war jedoch die Rohfraktion sehr gut wirksam gewesen und diese Wirkung konnte auf ein Arabinorhamnogalaktan zurückgeführt werden (57% bei Konz. 0.05%). Bei diesem Polysaccharid wird die Hauptkette von Rhamnose und Galaktose gebildet.⁽¹³²⁾ Dagegen besitzen *Abelmoschus* und *Okra*-Schleim übereinstimmend ein aus Galakturonsäure und Rhamnose (siehe Anhang S. 123) bestehendes Grundgerüst mit relativ ge-

ringer Verzweigung. Beide zeigten wie auch schon die Schleimpolysaccharide aus *Althaea* eine gute Wirksamkeit.

Die Ergebnisse des Granulozytentests lassen vermuten, daß neben der einfachen Zuckersequenz für die Wirksamkeit auch die Konformation eine Rolle spielt. Die verschiedenen getesteten Xylane besitzen alle ein aus 1,4 β -verknüpfter Xylose bestehendes Grundgerüst, haben jedoch sehr unterschiedliche Seitenketten, die offenbar für die Stärke der inter- und intramolekularen Assoziationen oder Anlagerungen an Membranen mitverantwortlich sind.

Von Glucanen mit Antitumorwirksamkeit, die in manchen Fällen auch mit einer Phagozytosesteigerung einhergehen, ist bekannt, daß der Verzweigungsgrad nachhaltig die pharmakologische Wirksamkeit beeinflußt (133,134). NISHIKAWA stellte eine unterschiedliche Wirksamkeit fest, wenn er verschiedene Lösungsmittel (DMSO, H_2O) verwendete, und wenn er die Glucane partiell derivatisierte oder denaturierte (135).

REES (136) unterscheidet im wesentlichen zwei verschiedene Grundformen: Polysaccharide mit bandförmiger Struktur ("ribbon-like"), in der auch 1,4 β -Xylane vorliegen, oder in helicaler Konformation, wie sie z.B. bei 1,3 β -Xylanen auftritt. Eine solche Sequenz kann durch nur einen einzigen anderen Zucker in der Kette abrupt verändert werden. Ebenso spielen die Seitenketten eine wichtige Rolle, da sie eine inter- oder intramolekulare Assoziation von Polysacchariden festigen oder verhindern können. Eine andere Ursache für das unterschiedliche Verhalten von pflanzlichen Polysacchariden könnte die nicht gleichmäßige Verteilung der Seitenketten im Molekül sein. Im Gegensatz dazu besitzen z.B. die Bakterien-Polysaccharide eine "repeating unit", also eine immer sich wiederholende Grundeinheit, während bei den Pflanzen-Polysacchariden die Substituenten z.B. blockartig auftreten können. DEA und Mitarb. (137)

untersuchten bei Arabinoxylanen(1,4 β -Xyl) die Konformationsänderungen unter Einfluß von Wärme und Kälte (Gefriertrocknung), und von verschiedenen Lösungsmitteln. Er fand, daß unter diesen physikalischen Parametern eine ständige Bildung und Auflösung von geordneten Assoziationen der Xylane stattfindet.

Diese im einzelnen dargelegten Ergebnisse dürften für die oft großen immunologischen Wirksamkeitsunterschiede verantwortlich sein.

Tabelle 18: Granulozytentest (49)

Rohfraktionen aus:	Phagozytose-Werte in % bei Konz.			
	0.1%	0.01%	0.001%	0.0001%
Hibiscus sabdariffa b)	13	23	17	-
Gingko biloba b)	13	19	23	-
Tilia officinalis b)	18	21	16	-
Tilia argentea b)	18	17	6	-
Chamomilla recutita b)	4	31	7	-
Carthamus tinctorius a)	13	26	5	6
Calendula off. a)	-	-	-	-
Arnica montana a)	-	39	44	11
Achyrocline saturoides a)	-	-	33	27
Baptisia tinctoria a)	-	-	-	-
Eleutherococcus senticosus a)	6	52	42	-
Althaea officinalis (Radix) b)	-	-	-	-
Phaseolus vulg. a)	9	15	-	-
Tilia spp. b)	-	4	29	-
Tussilago farfara b)	-	-	-	-
Symphytum officinale b)	-	34	43	-
Sabal serrulata b)	-	36	10	-
Echinacea purpurea a)	16	15	6	-

a) alkalisch-wässriger Extrakt

b) wässriger Extrakt

Tabelle 19: Granulozytentest (49)

Polysaccharide	Phagozytose-Werte in % bei Konz.		
	0.1%	0.01%	0.001%
Kamillenpolysaccharid A	20	58	1
Plantago-Schleim O aus Plantago major (Samen)	15	20	10
Abelmoschus-Schleim M aus Abelmoschus manihot (Wurzeln)	8	26	32
Althaea-Schleim OL aus Althaea off. (Blätter)	26	20	42
Althaea-Schleim O aus Althaea off. (Wurzeln)	33	50	51
Okra-Schleim aus Abelmoschus esculentus (Früchte)	41	30	47
Xylan aus Larix decidua	-	-	-
Arabinogalaktan aus Larix dec.	-	-	-
Xylan aus Glycine max	-	-	-
Glucomannan aus Orchis spp.	18	11	15
Arabinoxylan aus Triticum vulg.	-	-	-
Hemicellulose aus Phaseolus vulg.	7	12	4

Tabelle 20: Granulozytentest (49)

Gummen	Phagozytose-Werte in % bei Konz.		
	0.1%	0.01%	0.001%
Karaya Gummi			
Sterculia urens	-	-	-
austral. Gummi aus			
Acacia pycnantha	4	15	15
Gummi arabicum aus			
Acacia senegal	-	-	-
Gummi arab. aus			
Acacia senegal,	-	15	-
reduziert			
Gummi aus			
Araucaria bidwillii,	25	29	11
reduziert			

2.2. Biolumineszenz

Zur Testung verwendeten wir Vollblut, bzw. eine Granulozytenfraktion, der als "Substrat" opsonisiertes Zymosan beigegeben wurde. Das Zymosan muß vorher opsonisiert werden, damit die Phagozytose sofort einsetzt.

Die Biolumineszenz-Kurve (siehe Abb. 13 und 14, S. 83/84) der getesteten Substanz, die 10 Min. vor der Zugabe von Zymosan mit den Granulozyten bei 37°C inkubiert wurden, verglichen wir mit der Granulozytenfraktion und Lucigenin als Kontrolle. Verglichen wurden entweder die Peakmaxima oder die Kurvenflächen. Bei den Kamillenpolysaccharidtestungen erwiesen sich beide Methoden als gleichwertig.

Wir testeten das Kamillenpolysaccharid zuerst in den Konzentrationen, in denen es sich auch im Granulozytentest als wirksam erwiesen hatte (Tab. 20, S. 79). In den Konzentrationen von 0.1 und 0.01% war jedoch eine "suppressive" Wirkung zu verzeichnen, d.h. eine geringere Exkretion von Sauerstoffradikalen als bei der Kontrolle.

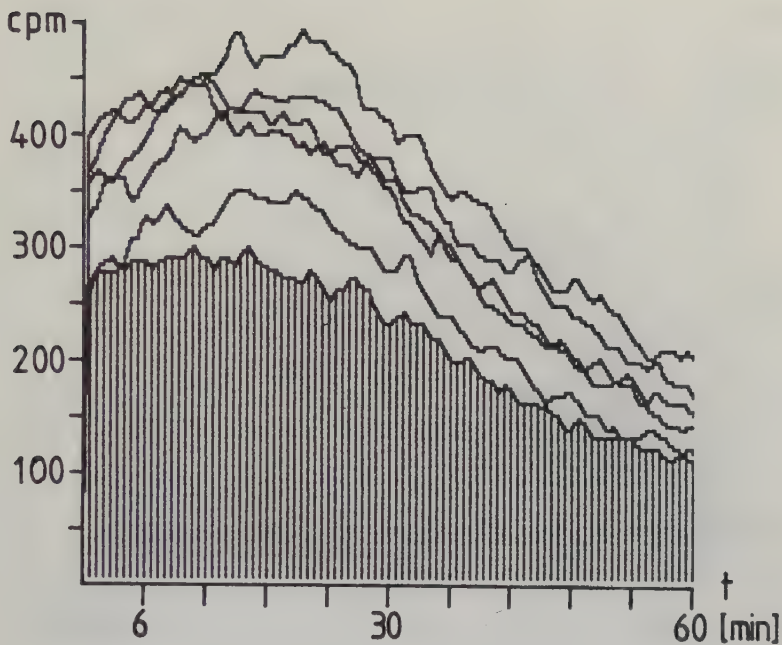
Die weiteren Verdünnungen waren stärker wirksam bis bei einer Konzentration von 10^{-6} ein Maximum an Biolumineszenz-Ausbeute (ca. 60%) erreicht war. Bei noch höheren Verdünnungen fielen die Werte stark ab. Das Maximum an Emission von Sauerstoffradikalen lag für alle Konzentrationen bei ca. 15 Minuten.

Bei dem Polysaccharid aus *Plantago major* lagen die Biolumineszenzausbeuten um fast 40% niedriger als beim Kamillenschleimpolysaccharid. Das Maximum war bereits mit 15% gegenüber der Kontrolle bei einer Konzentration von 10^{-2} erreicht. In Anbetracht der gleichmäßigen niedrigen Stimulation bei den anderen Konzentrationen dürfte es sich hier um einen Kanal- bzw. Meßfehler handeln. Das

Wirkmaximum wurde hier erst nach durchschnittlich 20 Min. und später erreicht.

Dieses Ergebnis korreliert gut mit jenem des Granulozyten-Versuchs nach BRANDT, bei dem der Plantagoschleim ebenfalls zu einer geringeren Phagozytosesteigerung führte, im Vergleich zum Kamillenpolysaccharid. Beide Schleime haben einen 1,4 β -Xylan-"backbone", unterscheiden sich aber in der Art ihrer Seitenketten (siehe Anhang S. 122).

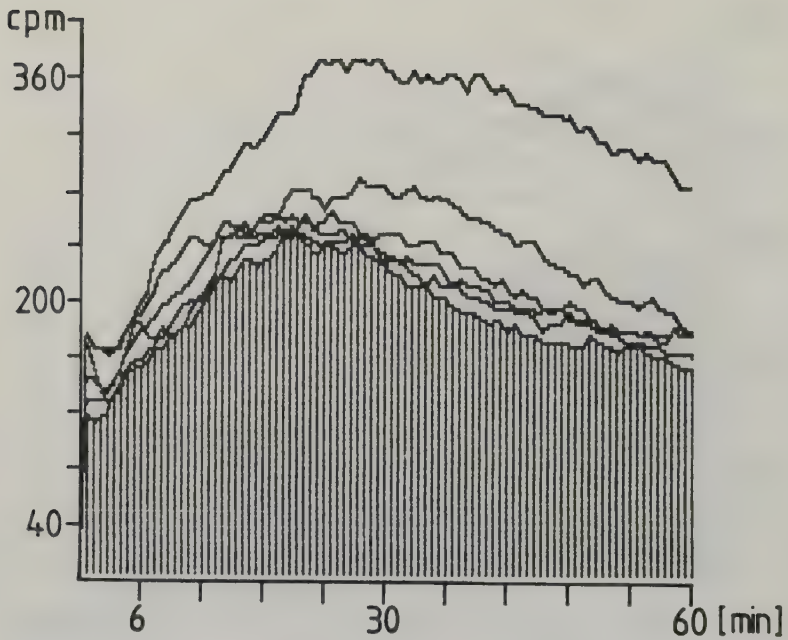
Neben Glucuronsäure besitzt der Plantagoschleim noch Galakturonsäure und Arabinose in den Seitenketten. Außerdem ist die Xylose nicht wie beim Kamillenschleimpolysaccharid nur über C-2, sondern auch über C-3 verzweigt.



Kanal	Konz. g/ml	Peak-Max. (cpm)	$t_{\max.}$ (min.)	Biolumineszenz- steigerung %
1	Kontrolle	302	16.0	-
2	10^{-3}	422	13.3	+40
3	10^{-4}	447	11.3	+48
4	10^{-5}	457	11.3	+51
5	10^{-6}	496	21.3	+64
6	10^{-7}	351	20.6	+16

Abb. 13

Biolumineszenz-Kurve des Kamillenpolysaccharids A



Kanal	Konz. g/ml	Peak-Max. (cpm)	t _{max} . (min.)	Biolumineszenz- steigerung %
1	Kontrolle	254	19.3	-
2	10 ⁻²	292	27.3	+15
3	10 ⁻³	266	19.3	+ 5
4	10 ⁻⁴	379	25.3	(+50)
5	10 ⁻⁵	268	24.6	+ 6
6	10 ⁻⁶	255	20.6	0

Abb. 14

Biolumineszenz-Kurve des Plantago-Schleims

2.3. Carbon-Clearance-Test (48)

Der Carbon-Clearance-Test ist im Gegensatz zu den vorher beschriebenen Versuchsanordnungen ein in-vivo-Test, den wir zur Messung der Phagozytose durch Makrophagen verwendeten.

Die Ergebnisse (siehe Tab. 21, S. 86) aus diesem Versuch lassen sich allgemein nicht mit den Ergebnissen aus den in-vitro-Versuchen korrelieren.

Bei *Matricaria recutita* waren die Rohschleimpolysaccharide gut aktiv, während das gereinigte Kamillenschleimpolysaccharid A nur noch die DSK-Note 1 erreichte. Bei *Althaea officinalis* beobachteten wir denselben Effekt, d.h. die Rohfraktion erreichte die DSK-Note 2, das gereinigte Polysaccharid nur 1. Allerdings erreichte das Kamillenpolysaccharid A mit dem Verhältnis des Regressionskoeffizienten der Kontrolle von 1.44 nahezu die DSK-Note der Rohfraktion. WAGNER und PROKSCH (59) fanden DSK-Werte von 2 mit Polysaccharidfraktionen aus Schleimdrogen wie *Sabal serrulata*, *Althaea officinalis*, *Arnica montana*, *Achyrocline saturoides*, *Calendula off.*, und auch bei Fraktionen aus *Eleutherococcus senticosus*, *Eupatorium cannabis* und *Echinacea purpurea*.

Im Gegensatz zu diesen Befunden fanden wir bei reinen Polysacchariden keine Steigerung der Clearance. Wie Tab. 22, S. 86, zeigt, erreichten sie in allen Fällen die DSK-Note 1; also hatten alle gegenüber der Kontrolle eine geringe Steigerung.

Bei den Rohfraktionen von *Tilia officinalis* und *T. argentea* fanden wir nur eine DSK-Note von 1.

Tabelle 21: Einfluß von Polysacchariden aus Pflanzen auf die
Carbon Clearance bei Mäusen
Konz.: 10 mg/kg x 1 Tag

Schleimpoly- saccharide aus	Regressions- Kontrolle	Koeffizient behandelt	Verhältnis RC_{tr}/RC_c	DSK- Note
Matricaria recut. (Rohfraktion)	-0.0731	-0.1848	2.5268	2
Althaeae off. (Rohfraktion)	-0.0597	-0.1306	2.187	2
Tilia officinalis (Rohfraktion)	-0.0277	-0.02843	1.0260	1
Tilia argentea (Rohfraktion)	-0.0277	-0.0275	0.99	0
Kamillenpoly- saccharid A	-0.0271	-0.0390	1.4376	1
Althaea off. (Schleim OL aus den Blättern)	-0.0277	-0.0339	1.225	1
Althaea off. (Schleim O aus der Wurzel)	-0.0277	-0.03067	1.1071	1

2.4. Andere Testmodelle

Neben den auf S. 71 ff beschriebenen Testverfahren wurden Kamillenfraktionen noch in drei weiteren in-vitro-Modellen getestet (siehe Tab. 22, S. 88).

T-Lymphozyten-Transformationstest (60)

Mit diesem Test mißt man den Induktionsgrad der Blastentransformation und die darauf folgende Proliferation von T-Lymphozyten. Die Transformation manifestiert sich durch Auftreten von großen Blastzellen und ihre Proliferation durch erhöhte DNA-Synthese. Ihre Mitose wird durch die erhöhte Einbaurate von radioaktiv markiertem Thymidin gemessen. Das ^{13}C - oder ^3H -markierte Thymidin, das in die Zell-DNA eingebaut wurde, kann am Flüssigkeits-scintillations-Spektrometer gemessen werden. Als Testmitogen wird das Phythämagglutinin, das Lektin aus *Phaseolus vulg.*, verwendet.

Die Kamillenrohfraktion und ebenso das Kamillenschleimpolysaccharid A zeigten nur geringe stimulierende Wirkung (2% von PHA bzw. 3% von PHA).

Erythrophagozytose opsonisierter Schafererythrozyten (138)

Bei diesem Test wird die zelluläre Zytotoxizität gemessen. ^{51}Cr -markierte Schafererythrozyten werden mit Kaninchen-Antiserum opsonisiert, und mit Leukozyten inkubiert, wobei ein Teil der opsonisierten Zellen phagozytiert und hämolytisch wird. Durch Trennung der intakten Zellen vom Medium kann die Phagozytoserate anhand des verbleibenden ^{51}Cr gemessen werden.

Die Phagozytose der Erythrozyten war unter Zusatz der Kamillenpolysaccharidrohfraktion doppelt so hoch (81%) wie die Kontrolle (45%).

Makrophagenmigrationshemmtest (60)

Der "Makrophageninhibierende Faktor" gehört zur Gruppe der Lymphokine, die von sensibilisierten T-Lymphozyten in Gegenwart eines Antigens gebildet werden können. Da die Bildung des MIF nicht die Anwesenheit von Antikörpern erfordert, ist seine Präsenz Ausdruck der zellulären Immunabwehr. Der MIF hemmt die Auswanderung der Makrophagen aus der Umgebung der Lymphozyten. Er steigert die Adhärenz und die Phagozytosefähigkeit der Makrophagen. Er erhöht ihre Fähigkeit, Bakterien und Tumorzellen zu zerstören oder ihr Wachstum zu behindern. Weiterhin erhöht der MIF die Glucoseoxidation, die wiederum ein Hinweis auf gesteigerte Stoffwechselfunktion ist. Die Inhibition wird gemessen, indem man den Austritt der Makrophagen aus einer Kapillare mißt und dann die Fläche der Migration mit und ohne Anwesenheit des zu testenden Polysaccharids miteinander vergleicht.

Die Kamillenrohfraktion bewirkte nur eine Hemmung von 4%.

Tabelle 22:

	Kamillen- rohfraktion	Kamillen- polysacch. A
T-Lymphozyten- Transformation	2% von PHA	3% von PHA
Erythrophagozytose opson.Schaferythrozyt.	81% (Kontrolle 45%)	
Makrophagen- migrationshemmung	4%	

3. Zusammenfassung der Testergebnisse

Die Homopolysaccharid-Fractionen aus der Kamille und Arnica besitzen bei einer Konzentration von 1 mg/kg mit nahezu 80%iger Hemmung des Viscerin-Carrageenin-Ödems eine gute antipholysogistische Wirkung. Kamille war außerdem noch im Kunststoffpellet-Test gut wirksam (87% bei Konz. 10 mg/kg), während beim UV-Erythem in keinem Fall eine Inhibierung erzielt werden konnte.

Im Granulozytentest zeigte das Kamillenschleimpolysaccharid unter den Polysacchariden mit Xylanstruktur die höchste Stimulierungsrate (88% bei einer Konzentration von 0,01%). Die Xylane aus *Salix verrulata* (113), aus *Eupatorium perfoliatum* (81) und aus *Echinacea purp.* (132) waren mit durchschnittlich 30%iger Phagozytosesteigerung ebenfalls gut wirksam.

In der Gruppe der Rhamnogalakturonane, die alle durchweg gut wirksam waren, zeigte das Schleimpolysaccharid aus den Althea-Wurzeln mit 80% bei 0,01 g/ml eine annähernd so hohe Steigerungsrate der Phagozytose wie das Kamillenpolysaccharid. Eine Ausnahme bildete der *Karaya Gummi*, der zwar dasselbe Strukturprinzip (siehe Anhang 3. 125) besitzt, jedoch unwirksam war, im Gegensatz zu den anderen Rhamnogalakturonanen aus *Abelmoschus* spp., die auch gute Wirksamkeit zeigten (47% und 42%).

Ein Vertreter aus der Gruppe der Glucomannane, aus *Orchis* spp. erreichte eine relativ geringe, aber immer noch signifikante Steigerung von max. 18%. Diese verhältnismäßig geringe Wirkung kann aber auch durch die schlechte Löslichkeit des Polysaccharids bedingt sein.

Allgemein war - von wenigen Ausnahmen abgesehen (Eleuthero-coccus, Arnica) - die Tendenz festzustellen, daß die Homofractionen weniger aktiv waren als die chemisch gut definierten Polysaccharide.

Aus den vorliegenden Ergebnissen können noch keine Rückschlüsse auf Zusammenhänge zwischen Struktur und Wirkung gemacht werden, jedoch läßt sich klar erkennen, daß bei der Interaktion der Polysaccharide mit der Immunzelle bzw. mit der Zellmembran die Sekundärstruktur eine nicht unbedeutende Rolle spielen dürfte. Die Sekundärstruktur wiederum ist von sehr unterschiedlichen Faktoren abhängig, z.B. Art, Lage und Verteilung der Seitenketten, Lösungsmittel, etc..

Im Biolumineszenz-Phagozytose-Test wurde für das Kamillenpolysaccharid eine signifikante Erhöhung der Exkretion von Sauerstoffradikalen gemessen. Interessanterweise wurden die Wirkmaxima bei wesentlich niedrigeren Konzentrationen als beim Granulozytentest erreicht.

Die Phagozytose opsonisierter Schafererythrozyten *in vitro* wurde bei Zusatz von Kamillenpolysaccharid um 81% gegenüber der Kontrolle mit 45% gesteigert.

Im Carbon-Clearance-Test war sowohl bei den getesteten Althaea-Fractionen als auch bei der Kamille-Rohfraktion eine umgekehrte Tendenz zum Granulozytentest erkennbar: die reinen Polysaccharide waren hier im Vergleich zu den Gesamtfractionen geringer wirksam. Konnten die Rohfraktionen von Althaea und Kamille noch mit der DSK-Note 2 bewertet werden, so war bei den einzelnen reinen Polysacchariden nur noch eine Wirksamkeit von DSK = 1 verblieben. Der zusätzlich noch getestete Rohschleim von *Tilia* spp. erreichte nur die DSK-Note 1.

Worauf diese Unterschiede zurückzuführen sind, kann vorerst noch nicht beantwortet werden. Möglicherweise besitzen Rohprodukte im Blutserum einen anderen Verteilungskoeffizienten als Reinpolsaccharide. Die Adjuvanswirkung von Begleitstoffen als Trägerstoffe wäre zu diskutieren.

E. Z U S A M M E N F A S S U N G

1. Aus dem mit Wasser extrahierten Schleim aus *Chamomilla recutita* wurde durch Alkoholfällung und Ionenaustausch-Gelchromatographie eine hochmolekulare Polysaccharidkomponente (MG 600.000) rein dargestellt. Das sehr gut wasserlösliche Kamillenpolysaccharid A enthält Xylose und 4-O-Methylglucuronsäure im Verhältnis 1:0.9 als Hauptkomponenten, sowie in geringen Mengen Arabinose.
2. Nach der Permethylierung und der ^{13}C -NMR-Spektroskopie besitzt das Polysaccharid eine über C-2 verzweigte, aus 1,4- β -verknüpfte, pyranosidisch gebundene Xylose bestehende Hauptkette. Der gesamte Anteil an 4-O-Methylglucuronsäure ist in der Seitenkette endständig, nicht reduzierend in α -Verknüpfung vorhanden. Jede zehnte Xylose liegt endständig gebunden vor. Arabinose kommt in Spuren ebenfalls endständig, nicht reduzierend, aber furanosidisch gebunden vor. Vermutlich liegt in dem Polysaccharid noch ein lineares Xylan in enger Assoziation vor.
3. Im Vergleich zu früheren, von anderen Autoren gemachten Strukturvorschlägen besitzt das von uns erhaltene Polysaccharid ein wesentlich höheres Molekulargewicht und eine weniger komplexe Zuckerzusammensetzung. Übereinstimmend war der hohe Gehalt an Glucuronsäure, doch weicht das Xylose/Glucuronsäure-Verhältnis von dem der früheren Untersuchungen deutlich ab.
4. Das Polysaccharid A gibt Kreuzreaktion mit Anti-Pneumokokken-Serum Typ 2 und 5 im Doppeldiffusionstest nach OUCHTERLONY. Das bedeutet, daß eine endständige, nicht reduzierende Glucuronsäure, die am C-4 methyliert sein kann, vorliegt. Aufgrund dieses positiven Ergebnisses wurden parallel Diffusionsteste mit Polysaccharidfraktionen und einzelnen Polysacchariden durchgeführt.

Hiernach ist die Methode für Screening-Untersuchungen mit geringsten Substanzmengen zum Nachweis endständiger, nicht reduzierender Glucuronsäure, bevorzugt in α -Verknüpfung in Pflanzenpolysacchariden, bzw. -Polysaccharidgemischen geeignet.

5. In immunologischen Untersuchungen an verschiedenen Phagozytosemodellen wurden die Stimulierungsraten für den Rohschleim aus Kamille und für das Kamillenpolysaccharid A gemessen.

Im Granulozyten-in-vitro-Test zeigte der Rohschleim mit 30% eine gute und das Polysaccharid A mit 60% eine sehr gute Steigerungsrate. Erwartungsgemäß wurde auch die Biolumineszenz phagozytischer Granulozyten deutlich erhöht (40%). Im in-vivo-Carbon-Clearance-Test (CCT) fanden wir umgekehrte Aktivitätsverhältnisse wie im Granulozytentest, d.h. die Polysaccharid-Rohfraktion aus *Chamomilla recutita* erwies sich als besser stimulierend als das reine Polysaccharid A. Bei den antiphlogistischen Untersuchungen ergab die Polysaccharid-Rohfraktion eine 65%ige Hemmung des Rattenpfotenödems.

6. In einer weiteren Untersuchungsreihe, die Hinweise auf Struktur-Wirkungs-Beziehungen geben sollte, erwiesen sich neben verschiedenen Xylanen, zu denen auch das Kamillenschleimpolysaccharid A zu rechnen ist, die Rhamnogalakturonane unter den Schleimpolysacchariden - und hier besonders ein Schleimpolysaccharid aus der *Althaea*-Wurzel - als besonders wirksam. Dieses im Granulozytentest erhaltene Ergebnis konnte auch im CCT reproduziert werden.

Die Ergebnisse zeigen insgesamt, daß neben der Zuckersequenz das Molekulargewicht, die Anwesenheit von Uronsäure (Galakturonsäure und/oder Glucuronsäure) sowie noch zusätzliche Charakteristika, wie z.B. die Sekundärstruktur für die Wirksamkeit von Bedeutung sein müssen. Die Sekundärstruktur wird insbesondere von der Art der Seitenketten bestimmt, jedoch scheint nur ein gewisser Grad an Verzweigkeit für die Wirkung notwendig, denn die hochverzweigten Gummen erwiesen sich im Granulozytentest alle durchweg unwirksam.

F. EXPERIMENTELLER TEIL

1.1. Herkunft der Droge

Handelsware der Fa. Klenk, Schweinfurt/Schwebheim:
Chamomillae recutitae Flos, böhmischer Herkunft, 1979.

1.2. Herkunft der Antiseren

Die Anti-Pneumokokkenserum Typ 1,2,3,5 und 8 waren Kaninchenserum für "Diagnostische Zwecke" der Fa. Paesel, Frankfurt/M. und des Statens Seruminstitut, Kopenhagen/Dänemark.

Das Anti-Pneumokokkenserum Typ 2 vom Pferd aus dem Jahre 1939 stellte uns Prof. Dr. Heidelberger, University Medical Center, Department of Pathology, New York, zur Verfügung.

1.3. Herkunft der Testsubstanzen

- 1) Polysaccharidfraktionen von *Tilia officinalis*, *Tilia argentea*, *Hibiscus sabdariffa* und *Ginkgo biloba*: Prof. Dr. G. Franz, Universität Regensburg.
- 2) Gumme aus *Acacia pycnantha* und die reduzierten Gummen aus *Acacia senegal* und *Araucaria bidwillii*: Prof. G. O. Aspinall, Department of Chemistry, Faculty of Sciences, York-University, Toronto/Canada.
- 3) Schleimpolysaccharide aus *Althaea officinalis*, aus *Abelmoschus manihot*, *A. esculentus* und aus *Plantago major*: Prof. M. Tomoda, Kyoritsu College of Pharmacy, Tokyo/Japan.
- 4) Die Polysaccharidfraktionen aus *Sabal serrulata*, *Carthamus tinctorius*, *Eupatorium perfoliatum*, *Echinacea purpurea*, *Orchis militaris*, *Tussilago farfara*, *Althaea officinalis*, *Plantago psyllium*, *Trigonella foenumgraecum*, *Cydonia oblonga*, *Linum usitatissimum*, *Calendula officinalis*, *Arnica montana* stammten aus eigenen Isolierungen.

- 5) Das Xylan und das Arabinogalaktan aus *Larix decidua*, Karaya Gummi und arabischer Gummi wurden von der Fa. Sigma, Taufkirchen, bezogen.

2. Allgemeine Arbeitsmethoden

2.1. Physikalisch-chemische Untersuchungen

Zuckeranalysator

Gerät: Biotronik ZA 5100
Säule: 0.6 cm x 27 cm
DA-X4-20, Durrum
Säulentemperatur: 58°C
Puffer: Boratpuffer pH 9.1/0.3 M
Farbreagenz: Orcin/Schwefelsäure, 0.1%
Pufferdurchfluß: 60 ml/h

Optische Drehung

Gerät: Perkin-Elmer Polarimeter 241
Küvette: Microküvette Schichtdicke 100 mm
Volumen 1 ml
Temperatur: Raumtemperatur
Medium: H₂O

Gaschromatographie

Gerät: Perkin-Elmer 900
Trägergas: Argon 30 ml/min
Detektor: FID
Temperatur: Detektor, Einspritzblock 250°C
Säulenofen, isotherm
Säule: Glas, 300 cm x 2.0 mm
3% OV-225 auch Chromosorb W-HP, 80/100 mesh
Integrator: Perkin-Elmer D 26
Standard: Alditolacetate von Rhamnose, Arabinose,
Xylose, Mannose, Galaktose und Glucose im
Verhältnis 1:1 (extern)
1,5-Di-O-Acetyl-2,3,4,6-tetra-O-methyl-
glucitol (extern)

¹H-NMR-Spektroskopie

Gerät: Bruker WP-200 SY

Medium: D₂O

Standard: TMS intern

Die Verschiebung der Signale wird nach der δ-Skala in ppm angegeben.

¹³C-NMR-Spektroskopie

Gerät: Bruker WP-200 SY (50.3 MHz)

Medium: D₂O

Temperatur: 60°C

Standard: Dioxan

Die Verschiebung der Signale wird nach der δ-Skala in ppm angegeben.

Gaschromatographie/Massenspektroskopie

Gaschromatographie:

Gerät: Carlo Erba Milano 2110

Trägergas: Helium 0.7 kp/cm²

Temperatur: Injektor: 240°C

Thermoelement 1 100°C

2 230°C

3 260°C

Programm 3°C/Min.

Säule: CP-Sil 5 25 m x 0.23 mm (Quarzkapillare)

OV 1701 30 m x 0.23 mm (Quarzkapillare)

Massenspektroskopie:

Gerät: Varian MAT CH 7A

Elektronenenergie: 70 eV

Temperatur der Ionenquelle: 200°C

2.2. Säulenchromatographie

Gele: -Sephacryl CL-6B

Effektiver Trennbereich: MG 10⁴ bis 10⁶

-Sephacryl S-500 fine u. superfine

Effektiver Trennbereich: MG 5 x 10⁴ bis 2 x 10⁶

-DEAE Sepharose CL-6B

Eluens: Wasser
0.0 bis 2 M NaCl

Pumpe: LKB 2132 Microperpex Pumpe
kalibriertes Volumen 1 ml
Schlauchdurchmesser 1.3 mm
Förderstrom 1 - 90 ml/h

Detektor: Differential Refraktometer R401
Waters Associates Inc.

Auftragemengen: 3 mg bzw. 150 mg/1 ml

Säulen: $\varnothing$ 16 mm, h = 560 mm, Totalvolumen 113 cm³
 $\varnothing$ 24 mm, h = 553 mm, Totalvolumen 250 cm³

2.3. Dünnschichtchromatographie

Adsorbentien:-Kieselgel 60 F₂₅₄-Fertigplatten
20 x 20 cm
Schichtdicke 0.25 mm
Hersteller Fa. Merck

-Kieselgel 60 F₂₅₄-DC-Alurolle
20 cm x 5 m
Schichtdicke 0.2 mm
Hersteller Fa. Merck

Laufmittelsysteme: Chloroform-Methanol-Wasser (8:5:1)
für Monosaccharide

Petrolether-Ethylacetat (6:4)
für acetylierte Zucker

Butanol-Methanol-Wasser (3:1:1)
für Oligosaccharide

Detektion: 10%ige H₂SO₄ in Ethanol,
dann 3 Min. im Trockenschrank 100°C

Anilin-Diphenylamin-85%ige H₃PO₄-Methanol
(2 ml, 2 g, 10 ml ad 100 ml)
dann 10 Min. im Trockenschrank bei 100°C.

3. Spezielle Arbeitsmethoden

3.1. Herstellung der Rohfraktion

150 g Kamillenblüten wurden je 3 Tage lang erschöpfend mit Petrolether und mit Methanol im Soxhlet extrahiert. Der Drogenrückstand wurde an der Luft getrocknet und dreimal mit der doppelten Menge Wasser (300 ml) im Turborührer unter Eiskühlung extrahiert (dreimal 5 Min. lang). Diese dickflüssige Mischung wurde in der Drogenpresse abgepreßt, der Drogenkuchen verworfen und das verbleibende dunkelbraune Filtrat mit 15.000 rpm 45 Min. zentrifugiert. Die vereinigten Überstände wurden im Rotationsverdampfer auf etwa die Hälfte eingengt, wobei die Temperatur in keinem Fall 40°C überschritt.

In dieses Konzentrat wurde im Kühlraum (bei 6°C) die vierfache Menge Ethanol eingetropt und dieser Ansatz eine Woche lang stehengelassen. Dann wurde der Überstand abgezogen und das Präzipitat noch einmal in der Ultrazentrifuge abzentrifugiert, um das restliche Ethanol zu eliminieren.

Dieses Präzipitat wurde in ca. 500 ml H₂O dest. aufgenommen und zur besseren Lösung bei 4°C zwölf Stunden lang mit einem Magnetrührer gerührt. Nach erneutem Abzentrifugieren des unlöslichen Rückstandes wurde der geklärte Überstand gefriergetrocknet.

Die Ausbeute betrug 6.1 g.

3.2. Isolierung des Kamillenschleimpolysaccharids A

Die Rohfraktion wurde zunächst mit Hilfe von diskontinuierlicher Diafiltration aufgetrennt:

Von der Rohfraktion wurden jeweils 1.0 g in 180 ml Aqua dest. (Volumen der Filtrationskammer von der Fa. Amicon, Typ 202) unter Druck aus der Stickstoffflasche (ca. 3 bis 4 bar) durch die Membran (BM 500, Ø 43 mm, Fa. Berghof) gefiltert. Das Retentatvolumen wurde jeweils wieder zu 180 ml mit Aqua dest. ergänzt, sobald das Lösungsvolumen auf 30 ml

abgesunken war. Dieser Vorgang wurde fünf Mal wiederholt. Retentat und Filtrat wurden jeweils gefriergetrocknet. Nach der Gefrier Trocknung wurde ein hochmolekularer Anteil von ca. 0.235 g und ein niedermolekularer Anteil von ca. 0.270 g je Filtrationsvorgang ausgewogen.

Der hochmolekulare Anteil wurde in Fraktionen von 150 mg aufgeteilt, in 1 ml Aqua dest. gelöst und über eine DEAE-Sepharose CL-6B aufgetrennt, wobei mit einer 0 bis 2 mola- ren NaCl-Lösung mit einem Gradientenmischer (Fassungsver- mögen: 500 ml) eluiert wurde.

Säule: $\varnothing = 24 \text{ mm}$, $l = 553 \text{ mm}$, Volumen: 250 cm^3
Gel: DEAE-Sepharose CL-6B (Fa. Pharmacia)
Durchlaufgeschw.: 54 ml/h
Gradient: 0 bis 1 M NaCl wurde in $5 \times 0.5 \text{ l}$ angelegt,
1 M bis 2 M NaCl in $1 \times 0.5 \text{ l}$
Detektion: Perkin-Elmer-Polarimeter 241

Es wurden jeweils alle 30 Min. Fraktionen gesammelt.

Der Hauptpeak (Kamillenpolysaccharid A) wurde in den Frak- tionen 129 - 131 eluiert.

Der kleine Peak B des Chromatogramms wurde in den Fraktio- nen 120 bis 129 eluiert.

Das Eluat wurde je 24 Stdn. gegen Leitungswasser und gegen Aqua dest. dialysiert. Die Ausbeute an Kamillenschleimpoly- saccharid A betrug 60 mg.

Diese Ionenaustauschromatographie wurde insgesamt sechs Mal wiederholt, so daß insgesamt ca. 0.3 g Reinsubstanz resul- tierten.

3.3. Analytik

3.3.1. Molekulargewichtsbestimmung (57)

Eine Säule ($\varnothing = 16 \text{ mm}$, $h = 560 \text{ mm}$, Volumen: 225 cm^3) wurde mit Sephacryl S-500 superfine gefüllt. Sie wurde drei Tage lang mit einer Durchflußgeschwindigkeit von 14 ml/h bei einer konstanten Temperatur von 8°C gewaschen.

Dieselbe Durchflußgeschwindigkeit wurde während des ganzen Versuchs beibehalten. Als Eluens diente Aqua dest.. Von den Eichsubstanzen wurden jeweils 3 mg aufgetragen, die Elutionsvolumina waren die folgenden:

		k_{av}
Xylose	345.1 ml (23.9 cm)	-
Dextran T 40	295.4 ml (19.3 cm)	0.7863
Dextran T 110	270.2 ml (21.1 cm)	0.6489
Dextran T 500	246.4 ml (18.0 cm)	0.5496
Dextranblau 2000	161.0 ml (11.5 cm)	0.505
Kamillenschleim- polysaccharid A	221.2 ml (15.8 cm)	0.5420

Der Verteilungskoeffizient (k_{av}) wurde nach den cm Laufstrecke auf dem Chromatogramm nach folgender Formel berechnet:

$$k_{av} = \frac{V_e - V_o}{V_t - V_o}$$

V_e = Elutionsvolumen
 V_o = Ausschlußvolumen (10.8 cm)
 V_t = Totalvolumen (23.9 cm)

3.3.2. Hydrolyse mit Trifluoressigsäure

2 bis 3 mg Polysaccharid wurden in 2 ml Trifluoressigsäure (2 N, 0.5 N) gelöst (0.5 mg/ml) und in einem 25 ml Schliffkolben auf dem Wasserdampfbad erhitzt (3h, 8h, 16h oder 32h). Nach Abkühlen wurde die Reaktionslösung unter mehrmaliger Zugabe von Methanol p.a. im Rotationsverdampfer eingeeengt, um die Trifluoressigsäure zu entfernen.

Der getrocknete, säurefreie Rückstand wurde zur quantitativen Analyse am Biotronik ZA 5100 Zuckeranalysator am Institut für Holzforschung der Ludwig-Maximilians-Universität in München verwendet. Das gleiche Hydrolysat wurde auch zur qualitativen DC-Zuckerbestimmung verwendet.

3.3.3. Carbazoltest zur quantitativen Bestimmung der Uronsäure(73)

Reagenz A: 0.025 M Dinatriumtetraborat-10-hydrat p.a.
in konz.Schwefelsäure p.a.

Reagenz B: 0.125% Carbazol in Methanol p.a.

Reagenz C: Glucuronsäurelacton-Standardlösungen von
4 - 40 µg/ml in mit Benzoesäure gesättigtem
Aqua dest.

In Schliffstopfenreagenzgläsern wurden 5.00 ml Schwefelsäurereagenz pipettiert, die in einem Kühlbad von 4°C standen. Dann wurde das Reagenz vorsichtig mit 1.00 ml Probe bzw. Standardlösung C überschichtet. Die Gläser wurden verschlossen und erst vorsichtig und dann kräftiger geschüttelt. Die Temperatur sollte auf keinen Fall die Raumtemperatur überschreiten. Nach dem Mischen erhitzen wir 30 Min. auf dem Wasserdampfbad. Nach Abkühlen auf Raumtemperatur versetzten wir die Lösungen mit 0.2 ml Carbazollösung (Reagenz B), und dann schüttelten und erhitzen wir die Lösungen ein zweites Mal je 15 Min. auf dem Wasserdampfbad.

Nach Abkühlen auf Raumtemperatur wurden die Extinktionen bei 530 nm gegen eine gleichbehandelte Blindlösung gemessen.

Extinktionen: Reagenz C	5 µg/ml	0.125
	10 µg/ml	0.197
	20 µg/ml	0.425
	30 µg/ml	0.612
	40 µg/ml	0.812
Kamillen-	20 µg	0.146
polys. A	50 µg	0.289
(0.5 mg/ml)	100 µg	0.866
	250 µg	1.796

3.3.4. Darstellung der Alditol-Acetate (77)

2 mg Polysaccharid wurden in 3 ml 0.5 N Trifluoressigsäure gelöst und 8 bzw. 16 Stdn. unter Rückfluß am Wasserbad erhitzt. Die Trifluoressigsäure wurde dann wiederholt mit Methanol p.a. unter Vakuum zur Trockne eingeeengt, bis

die verbleibende wässrige Lösung neutral reagierte. Die Lösung wurde in zwei Teile aufgeteilt, zu der einen Lösung wurde eine Spatelspitze NaBH_4 und zur anderen NaBD_4 zugegeben (alkalische Reaktion). Diese Lösung wurde 2 Stdn. bei Raumtemperatur belassen. Zur Zerstörung des überschüssigen Natriumborhydrid/-deuterid wurde Ionenaustauscherharz Dowex 50 (H^+) zugesetzt, bis der pH-Wert des Reaktionsgemisches auf ca. 3.5 gesunken war. Die Lösung wurde gefiltert und im Rotationsverdampfer zur Trockne eingengt. Der Rückstand wurde mit etwa 2 ml Essigsäureanhydrid versetzt und eine Stunde am Wasserdampfbad erhitzt. Im Anschluß daran wurde das Reaktionsgemisch solange unter Vakuum mit Toluol abgedampft, bis keine Essigsäure mehr in der Lösung vorhanden war. Der getrocknete Rückstand wurde in Dichlormethan aufgenommen, das dann noch dreimal mit wenig Wasser gegengesüttelt wurde. Das Dichlormethan wurde im Vakuum abdestilliert und der Rückstand zur GC-Analyse in entsprechendem Lösungsmittel aufgenommen.

3.3.5. Darstellung der partiell methylierten Alditol-Acetate (77)

Ca. 5 mg Substanz wurden in einem 25 ml Injektionsfläschchen in 3 ml getrocknetem DMSO (Molekularsieb 4 Å) gelöst und zur Verbesserung der Löslichkeit ins Ultraschallbad gestellt (1/2 Stde. bis 12 Stdn. in halbstündigen Intervallen). Vor der Versiegelung wurde das Fläschchen mit Stickstoff gesättigt. Dann wurde über eine Injektionsnadel 2 ml 2 molares Dimethylsulfat (Natrium-methyl-sulfinylmethanid) zugetropft. Der Ansatz wurde anschließend eine halbe Stunde im Ultraschallbad belassen und dann bei Raumtemperatur über Nacht stengelassen. Dann wurde sehr langsam unter Eiskühlung über eine Injektionsnadel 2 ml Methyljodid zugetropft; eine zweite Injektionsnadel mußte zum Druckausgleich angebracht werden. Daraufhin wurde das Reaktionsgemisch wiederum eine Stunde im Ultraschallbad belassen und anschließend

in einen Spitzkolben übergeführt, damit das Reaktionsgemisch im Rotationsverdampfer von dem überschüssigen Methyljodid befreit werden konnte. Dann wurde die Lösung 24 Std. lang gegen Leitungswasser und anschließend 24 Std. gegen Aqua dest. dialysiert. Der Rückstand wurde gefriergetrocknet. Zur Darstellung der Alditolacetate wurde anschließend mit 0.5 N Trifluoressigsäure 8 Std. auf dem Wasserdampfbad hydrolysiert. Nach Entfernung der Trifluoressigsäure mit Methanol p.a. wurde - wie in 3.3.4., S. 100, beschrieben - verfahren und das Substanzgemisch in die Alditolacetate übergeführt.

3.3.6. Reduktion

9.4 mg des Kamillenpolysaccharids A wurden in 5 ml Wasser gelöst und es wurde dazu 0.1 g 1-Cyclohexyl-3-(2-morpholinoethyl)-carbodiimidmetho-p-toluolsulfonat (CMC) hinzugefügt. Durch Titrieren mit 0.1 N Salzsäure wurde der pH unter Rühren 2 Std. lang auf 4.75 eingestellt. Anschließend wurde 1 ml 2 M Natriumborhydrid langsam dem Reaktionsgemisch hinzugefügt, unter Aufrechterhaltung des pH-Wertes bei 7.0 mit 4 N Salzsäure bei Raumtemperatur und während 4 Std. Dann wurde die Reaktionslösung über Nacht gegen destilliertes Wasser dialysiert und anschließend gefriergetrocknet. Dieser Vorgang wurde noch drei Mal wiederholt. Die Ausbeute betrug 3.9 mg, davon wurde mit 0.9 mg eine direkte Hydrolyse mit Trifluoressigsäure ausgeführt und mit den restlichen 2 mg wurde wie in 3.3.5., S. 101, nach HAKOMORI methyliert, dann hydrolysiert, reduziert und acetyliert.

3.3.7. Periodatoxidation (99)

5 mg Polysaccharid wurden in 10 ml 0.05 M NaIO_4 -Lösung (pH 5) gelöst und 7 Tage im Dunkeln bei 4°C gerührt. Nach Ablauf dieses Zeitraumes wurden 0.3 ml Ethylenglykol zugesetzt, um den Überschuß an Natriumperjodat zu zerstören. Das Reaktionsgemisch wurde weitere 2 Std. unter

Rühren im Dunkel belassen. Im Anschluß daran wurde die Lösung 24 Stdn. gegen Leitungswasser und dann noch 24 Stdn. gegen H_2O dialysiert und gefriergetrocknet. Der Rückstand wurde mit 2 ml H_2O gelöst und 3 mg NaBH_4 hinzugefügt und nach Auflösung 24 Stdn. stehengelassen. Im Anschluß daran wurde die Lösung wiederum 24 Stdn. lang dialysiert und dann gefriergetrocknet.

Anschließend wurde der Rückstand mit Trifluoressigsäure (0.5 N, 8 Stdn., 100°C) hydrolysiert und - wie in 3.3.4., S. 100, bereits beschrieben - in die Alditolacetate übergeführt.

3.3.8. Alkalischer Abbau (102)

5.8 mg wurden in der unter 3.3.5., S. 101, beschriebenen Methode nach HAKOMORI methyliert. Das entstandene Reaktionsgemisch wurde nach Abdampfen des überschüssigen Methyljodids im Injektionsgläschen belassen und mit Hilfe einer Injektionsnadel wurden 2 ml 1 M Dimsyl langsam zuge tropft. Das Reaktionsgemisch wurde 16 Stdn. bei Raumtemperatur belassen und dann unter Eiskühlung mit einer Injektionsnadel 1.5 ml deuteriertes Methyljodid zuge tropft. Das Reaktionsgemisch wurde eine Stunde lang im Ultraschallbad belassen und dann das überschüssige Methyljodid im Vakuum abdestilliert. Zu dieser Lösung fügte man 5 ml H_2O dest. zu und schüttelte viermal mit 3 ml DCM aus. Die vereinigten DCM-Phasen wurden wiederum mit H_2O dest. ausgeschüttelt. Um die Phasen besser trennen zu können, wurde jedes Mal abzentrifugiert.

Die wässrigen Phasen wurden vereinigt und über Nacht gegen Leitungswasser, dann noch 24 Stdn. gegen H_2O dest. dialysiert und anschließend gefriergetrocknet. Aus dieser Substanz stellten wir nach 3.3.4., S. 100, Alditolacetate her. Ein Anteil wurde ein zweites Mal mit deuteriertem Methyljodid permethyliert, wobei wie in 3.3.5., S. 101, verfahren wurde, mit dem Unterschied, daß das deuterierte Methyljodid diesmal 5 Stdn. lang mit dem

Reaktionsgemisch belassen wurde. Die Dichlormethan-Phasen wurden ebenfalls vereinigt und das Lösungsmittel unter Vakuum abgedampft. Das Gemisch wurde mit Trifluoressigsäure (0.5 N, 8 Stdn., 100°C) hydrolysiert, wie in 3.3.2., S. 99, beschrieben und anschließend zu den Alditolacetaten derivatisiert (3.3.5., S.101).

3.3.9. Partialhydrolyse

20.3 mg des Kamillenschleimpolysaccharids A wurden in 12 ml 0.05 N Trifluoressigsäure gelöst und bei 95°C unter Rückfluß erhitzt. Die Reaktion wurde über DC im Laufmittel Butanol-Methanol-Wasser (3:1:1) kontrolliert. Die Chromatogramme wurden mit H_2SO_4 10%/MeOH detektiert. Nach acht Tagen beendeten wir die Hydrolyse und trennten die Bruchstücke über eine Kieselgel (60 HF 254, Fa.Merck)-Säule. Als Eluens verwendeten wir wieder BuOH/MeOH/ H_2O 3:1:1. Um die sehr geringe Durchlaufgeschwindigkeit von 1 Tropfen/Sek. zu erhöhen, wurde mit Hilfe eines oben an der Säule angebrachten Gummiballons, der mit Stickstoff gefüllt wurde, zusätzlich Druck ausgeübt. Die Fraktionen wurden in Intervallen von 15 Min. gesammelt. Folgende Fraktionen enthielten die Bruchstücke des Polysaccharids:

Fraktion 1	Glas	63 - 66	R_F : 0.31	1 mg
Fraktion 2		126 - 136	0.14	2 mg
Fraktion 3		185 - 200	0.07	2 mg

Acetolyse: 2.5 mg des Polysaccharids wurden in 0.5 ml Acetanhydrid gelöst, dem 0.1% H_2SO_4 conc. zugesetzt worden war. Dieser Schwefelsäureanteil wurde nach 4 Tagen auf 10% erhöht. Nach einer Woche wurde der Versuch abgebrochen, da auf der DC (Laufmittel: Petrolether-Ethylacetat 6:4) keine Flecken mit Schwefelsäure detektiert werden konnten.

3.3.10. Immundiffusion

Antisera: -AntiPneumokokkenserum Typ 2 aus dem Jahre
1939 vom Pferd

-AntiPneumokokkenserum Typ 1,2,3,5 und 8
zu diagnostischen Zwecken vom Kaninchen

Milieu: -1% Agarose, hohe EEO, Fa.Serva
1% NaCl
Phosphatpuffer pH 7.4

Die Polysaccharidkonzentrationen betrugen zwischen 0,8
und 5,0 mg/ml Aqua dest. oder isotonischer Kochsalz-
lösung.

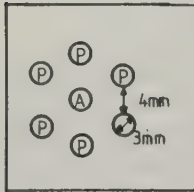
Die Antisera wurden entweder unverdünnt oder 1:1 mit
isotonischer Kochsalzlösung verdünnt angewendet.

Das Agarosepulver und das Kochsalz wurden in der Puffer-
lösung auf dem Wasserdampfbad für das erste Mal minde-
stens 2 Stdn. lang gelöst. Dann wurden 10 ml der heißen
Lösung auf einer planen Unterlage auf eine 84 x 94 mm
große Plastikplatte gegossen. Beim Erkalten bildete sich
eine durchsichtige und gleichmäßig ca. 1 mm dicke Schicht
aus Agarosegel. Darin wurden mit einer entsprechenden
Schablone kreisförmig Löcher gestanzt (siehe Abb. 15,
S. 106) (LKB Multiphor 2117 Kit). In diese Löcher konn-
ten mit Hilfe einer Eppendorfpipette jeweils 5 bis max.
10 µl Antiserum oder Polysaccharid-Lösung gefüllt werden.

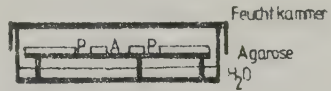
In den meisten Fällen war es notwendig, die Löcher mehr-
mals aufzufüllen, um die Präzipitation sichtbar zu ma-
chen. Dies wurde nur dadurch beschränkt, daß nach ca.
10 Tagen trotz Feuchtigkeitskammer und tiefer Temperatur
das Gel austrocknete und seine Durchsichtigkeit verlor.

Die Diffusionen wurden bei Raumtemperatur und im Kühlschrank vorgenommen.

Die Präzipitationen wurden mit bloßem Auge bei Tageslicht als weiße Zonen detektiert.



Aufsicht



A = Antiserum

P = Polysacch.-Lösung

Querschnitt

Abb. 15

Zweidimensionale Immundiffusion

3.4. Meßdaten

3.4.1. Massenspektren der partiell methylierten Alditol-acetate von Polysaccharid A

-1,4-Di-O-acetyl-2,3,5-tri-O-methyl-pentitol (am C-1 deuteriert):

m/z (rel.Int. %):

162(2.3), 161(25), 145(4), 130(4.2), 129(51), 119(9),
118(100), 117(4), 102(29), 101(22), 88(6), 87(21),
85(1.7), 72(8), 71(16), 70(3), 60(3), 59(10), 57(5),
46(4), 45(52), 44(42), 43(> 100).

-1,4-Di-O-acetyl-2,3,4-tri-O-methyl-pentitol (am C-1 deuteriert):

m/e (rel.Int. %):

219(0.05), 218(0.43), 217(0.26), 189(0.46), 162(26),
161(25), 131(5), 130(6), 129(7), 119(7), 118(97),
117(>100), 103(7), 102(87), 101(89), 89(7), 88(16),
87(19), 75(7), 74(5.3), 73(6), 72(5.2), 71(6), 60(5),
59(15), 58(11), 46(4), 45(28), 44(26), 43(>100), 43(7).

-1,4,5-Tri-O-acetyl-2,3-di-O-methyl-pentitol (am C-1 deuteriert):

m/z (rel.Int. %):

234(0.13), 233(0.23), 190(3), 189(18), 162(5), 131(4),
130(11), 129(60), 119(6), 118(>100), 117(9), 103(3),
102(25), 99(8), 89(4), 88(8), 87(40), 71(5), 59(8),
45(7), 44(18), 43(>100), 42(5).

-1,2,4,5-Tetra-O-acetyl-3-methyl-pentitol (am C-1 deuteriert):

m/z (rel.Int. %):

201(2), 190(10), 189(14), 172(8), 159(8.5), 148(16),
147(15), 131(16), 130(62), 129(61), 118(31.5), 117(9),
115(46.5), 114(9), 112(15), 88(93), 87(100), 85(14.5),
82(12), 75(10), 72(26), 71(17), 70(12), 69(11), 60(10),
59(26), 45(13), 44(54), 43(>100), 42(12).

-1,2,5-Tri-O-acetyl-6-deoxy-3,4-di-O-methyl-hexitol
(am C-1 deuteriert):

m/z (rel.Int. %):

234(1.5), 212(1), 191(2), 190(27), 174(3), 160(3),
132(8), 131(100), 130(47.5), 129(6), 115(13), 105(6),
101(10), 91(7), 89(67), 88(26), 87(12), 85(6), 73(6),
72(15), 71(9), 69(6), 60(8), 57(5), 55(7), 45(17),
44(47), 43(>100).

3.4.2. ¹³C-NMR-Spektroskopie

Kamillenschleimpolysaccharid A

(D₂O, 323 K, 50.3 MHz, Dioxan intern)

(ppm)	Integral	Intensität
176.4162	-11.772	- 4.213
161.2512	- 3.717	- 2.704
101.6820	16.250	2.802
101.2775	13.781	2.922
97.5332	25.800	5.233
82.2002	38.949	7.625
78.0181	6.403	1.869
77.7267	4.299	1.975
76.7343	65.530	5.358
76.0143	13.464	3.209
74.1444	4.116	1.911
73.6489	18.515	3.612
73.1058	19.507	4.094
72.5820	31.474	6.967
72.1504	62.079	12.450
71.2441	38.830	7.629
62.7370	-25.686	- 3.182
59.5063	26.378	6.738
20.4090	10.697	1.857

4. Immunologische Testungen

4.1. Granulozytentest

Granulozyten- 15 ml heparinisiertes Blut wurden im Ver-
Suspension: hältnis 2:1 mit einer 1.5%igen Lösung
Dextran T 500 gemischt und 30 Min. bei 25°C
sedimentiert. Der Überstand wurde in ein
steriles Reagenzglas übergeführt und 7 Min.
bei 500 g zentrifugiert.
Die abzentrifugierte Leukozytenfraktion wurde
zwei Mal mit Medium RPMI 1640 (Fa. Gibco,
Europe) gewaschen und durch Verdünnen auf
eine Konzentration von 5×10^6 Zellen/ml
eingestellt (Neubauersche Zählkammer).

Hefe- Bäckerhefe wurde in physiologischer Koch-
suspension: salzlösung aufgelöst, 30 Min. gekocht, an-
schließend drei Mal durch Gaze gefiltert
und geschüttelt. Anschließend wurde die
Suspension mit 0.9%iger NaCl auf 3 bis
 5×10^7 Partikel/ml eingestellt.

Poolserum: 0.5 ml Serum eines gesunden Spenders wurden
mit 4.5 ml Kochsalzlösung versetzt.

Je 0.2 ml der Zellsuspension, der Hefesuspension und des
Poolserums wurden mit 0.2 ml der Testsubstanz einer Blind-
lösung in einem sterilen Plastikröhrchen gemischt und in
einem Wasserbad bei 37°C 10 Min. lang geschüttelt. Dann
wurden 500 µl auf einen Objektträger gebracht und in einer
Feuchtkammer bei Raumtemperatur nochmals 50 Min. inkubiert.
Die Objektträger wurden vorsichtig in physiologischer Koch-
salzlösung gewaschen, mit einem Fön getrocknet und wie
folgt gefärbt:

Färbung: (nach Pappenheim)

Die Objektträger wurden in folgende Lösungen getaucht:

5 Min. May-Grünwald-Lösung

2 Min. Aqua dest.

15 Min. Giemsa-Lösung (5 ml in 180 ml Aqua dest.)

4 Min. Aqua dest.

Die gefärbten Objektträger wurden anschließend an der Luft getrocknet.

Auszählung: Pro Testung wurden die phagozytierten Hefepartikel, die sich blau gefärbt haben, in 100 Granulozyten ausgezählt. Aus dem Phagozytoseindex, der die durchschnittliche Anzahl phagozytierter Hefepartikel pro Granulozyt angibt, konnte dann im Vergleich zu einer Blindlösung die Phagozytosesteigerung bzw. -suppression der getesteten Substanz berechnet werden:

$$\frac{I_t - I_o}{I_o} \times 100$$

I_t = Phagozytoseindex der Testsubstanz

I_o = Phagozytoseindex I_o der Blindlösung = 2.58

Beispiel: Kamillenpolysaccharid A

Phagozytoseindex der Blindlösung = 2.58

Konz. (g/ml)	Phagoz.Ind. I_t
10^{-1}	3.08
10^{-2}	4.09
5×10^{-3}	4.00
2×10^{-3}	3.48
10^{-3}	2.59

4.2. Biolumineszenz-Test (50)

opsonisiertes Zymosan: 25 mg Zymosan wurden 30 Min. lang auf dem Wasserbad in 10 ml physiologischer Kochsalzlösung erhitzt. Von dieser Lösung wurden 2 ml mit 2 ml Serum 30 Min. lang bei Raumtemperatur vermischt, zentrifugiert, gewaschen und mit 2 ml 0.9% NaCl versetzt.

Lucigeninlösung: 25.5 mg wurden erst in 10 ml Aqua bidest. gelöst (5 mM) und dann nochmals mit physiologischer Kochsalzlösung 1:5 verdünnt (1 mM).

PMNL-Fraktion: 20 ml Blut eines gesunden Spenders wurden mit 30 mg EDTA als Gerinnungshemmer versetzt. Von diesem Blut wurden 15 ml mit 7 ml Dextran-Lsg. (1.5% Dextran T 500) gemischt, um die Erythrozyten abzusedimentieren. Das Überstehende, leukozytenreiche Plasma wurde in ein steriles Plastikröhrchen übergeführt und 10 Min. bei 1000 U/Min. zentrifugiert. Zur Entfernung der noch verbliebenen Erythrozyten wurde das Sediment in 20 ml 0.2% NaCl suspendiert, am Whirlimix geschüttelt und nach Zugabe von 20 ml 1.6% NaCl wiederum geschüttelt und wieder zentrifugiert (10 Min./2000 U/Min.). Diese hypotone Lyse mußte 1 bis zwei Mal wiederholt werden. Dieses Sediment wurde in 2 ml PBS ohne $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$ suspendiert.

Diese Suspension wurde 1:10 mit Türks-Lsg. verdünnt, um die Zellzahl bestimmen zu können. Nach dieser Auszählung wurde die Zellsuspension mit PBS-Puffer ohne $\text{Mg}^{2+}/\text{Ca}^{2+}$ auf 10^6 Zellen/ml eingestellt.

PBS-Puffer

ohne Mg^{2+}/Ca^{2+} : steril Fa. Biochrom, Berlin

Veronal-Puffer

Ca^{2+} , Mg^{2+} , Glu

und Albumin: 8.3 g NaCl

1.02 g Na 5,5-Diethylbarbiturat

102 mg $MgCl_2$

22 mg $CaCl_2$

200 mg Rinderserumalbumin

200 mg Glucose

3.5 ml HCl 1M

ad 200 ml H_2O dest.

40 ml dieser Stammlösung wurden zu 180 ml Aqua bidest. gelöst, der pH mit HCl 1 M auf 7.3 eingestellt und auf 200 ml mit Aqua bidest. aufgefüllt und sterilfiltriert.

200 μ l der Testlösungen bzw. der Blindlösung wurden mit 645 μ l Veronal-Puffer, 15 μ l PMNL-Suspension und 100 μ l Lucigenin-Lösung unter dem Laminar Flow in einem sterilen Plastikröhrchen gemischt. Die Lösungen wurden 10 Min. lang im 6-Kanal-Bioluminat auf 37°C temperiert und dann wurden 40 μ l des opsonisierten Zymosan hinzugefügt und dann während 60 Min. die Biolumineszenz gemessen und aufgezeichnet.

Die Messungen wurden am 6 Kanal Biolumat LB 9505, Fa. Berthold, Wildbad, vorgenommen.

4.3. Carbon-Clearance-Test

Kohle-

suspension: 16 mg/ml Kohle in physiologischer Kochsalzlösung mit 1% Gelatine suspendiert.

Mäuse: 15 bis 20 g, männl. oder weibl.

24 Stdn. vor Beginn des Tests wurden die Mäuse mit der Testsubstanz in der Konzentration 10 mg/kg in die Schwanzvene

gespritzt. Dieselbe Anzahl Mäuse wurde zur Kontrolle nur mit Kochsalzlösung gespritzt.

Am folgenden Tag wurde den Mäusen 0.2 ml/20 g der auf 37°C vorgewärmten Kohlesuspension gespritzt. Jeweils 3, 6, 9, 12 und 15 Min. nach der Injektion wurden jeder Maus mit einer Mikropipette 15 µl Blut aus dem retroorbitalen Plexus entnommen. Das entnommene Blut wurde in 2.0 ml Aqua dest. hämolysiert und die KohleKonzentration photometrisch bei 650 nm bestimmt. Nach Beendigung der Blutentnahme wurde den Tieren Leber und Milz herauspräpariert und gewogen.

Berechnung der "Carbon-Clearance"

Zwischen den Zeiten der Blutentnahme und dem log der Extinktionen der Kohle/Blutsuspensionen besteht ein linearer Zusammenhang: $\log E = RC_{tr} t + b$, die Steigung RC_{tr} der Geraden wird auch als Regressionskoeffizient bezeichnet. Aus dem Verhältnis des Regressionskoeffizienten RC_{tr} der Testsubstanz und dem Regressionskoeffizienten der Kontrolle RC_c wird die Phagozytoseaktivität bestimmt und nach deren Verhältnis die DSK-Note vergeben.

RC_{tr}/RC_c	<1.0	Suppression
	<1.5	DSK-Note 1
	>1.5	DSK-Note 2

Der sog. korrigierte Phagozytoseindex α berücksichtigt bei der Berechnung der Carbon-Clearance den Anteil an Leber- und Milzgewicht am Körpergewicht nach der folgenden Formel:

$$3^2\sqrt{RC} \frac{KG}{M + L} = \alpha$$

KG	= Körpergewicht der Maus
M	= Milzgewicht der Maus
L	= Lebergewicht der Maus
α	= korrigierter Phagozytoseindex
RC	= Regressionskoeffizient

Das Verhältnis der Indices der Testsubstanz und der Kontrolle wird wiederum nach dem DSK-System bewertet.

Folgende Extinktionen wurden bei den einzelnen getesteten Substanzen (Konz. 10 mg/kg) gemessen:

	Extinktion 640 nm	Zeit (Min.)	KG	L	M (g)
Kamillenschleim- polysaccharid A	0.352	3	28	1.301	0.118
	0.23	6			
	0.173	9			
	0.13	12			
	0.072	15			
	0.432	3	31	1.547	0.132
	0.292	6			
	0.232	9			
	0.21	12			
	0.185	15			
	0.405	3	30	1.393	0.142
	0.33	6			
	0.272	9			
	0.24	12			
	0.185	15			
	0.361	3	33	2.009	0.228
	0.28	6			
	0.196	9			
	0.16	12			
	0.10	15			
Kontrolle	0.79	3	37	1.862	0.139
	0.515	6			
	0.43	9			
		12			
	0.29	15			
	0.665	3	33	1.589	0.117
	0.375	6			
	0.423	9			
	0.34	12			
	0.323	15			

	Extinktion 640 nm	Zeit (Min.)	KG	L	M (g)
Tilia off.	0.55	3	33.5	1.747	0.187
-Rohfraktion	0.57	6			
	0.349	9			
	0.279	12			
	0.29	15			
	0.49	3	34	1.745	0.181
	0.365	6			
	0.231	9			
	0.19	12			
	0.13	15			
Tilia arg.	0.61	3	35.5	1.809	0.168
-Rohfraktion	0.43	6			
	0.38	9			
	0.305	12			
	0.274	15			
	0.51	3	35	1.822	0.161
	0.455	6			
	0.28	9			
	0.202	12			
	0.21	15			
Althaea off.	0.563	3	32	1.562	0.151
Schleim OL	0.372	6			
	0.340	9			
	0.300	12			
	0.09	15			
	0.462	3	33	1.781	0.163
	0.282	6			
	0.439	9			
	0.402	12			
	0.311	15			

	Extinktion 640 nm	Zeit (Min.)	KG	L	M (g)
Althaea off.	0.482	3	32	1.667	0.169
Schleim 0	0.355	6			
	0.290	9			
		12			
		15			
	0.45	3	30.5	1.599	0.162
	0.329	6			
	0.313	9			
	0.449	15			
Kontrolle	0.46	3	33	1.665	0.163
	0.36	6			
	0.272	9			
	0.193	12			
	0.130	15			
	0.485	3	34.5	2.041	0.168
	0.350	6			
	0.260	9			
	0.195	12			
	0.145	15			

G. A N H A N G

1. Chemie der Schleimstoffe

Zum besseren Verständnis vor allem des pharmakologischen Teils dieser Arbeit sollen hier kurz tabellarisch die Hauptgruppen der Schleimpolysaccharide und Gummen aufgeführt werden, soweit ihre Struktur bisher bekannt ist. Chemisch sind Gummen von Schleimen nicht zu unterscheiden. Es handelt sich um Makromoleküle, bestehend aus Zuckern und evtl. Uronsäuren, mit einem Molekulargewicht von ca. 50.000 bis 2 Mill. Sie können auch kovalent an einen Proteinanteil gebunden sein (Tab. 23, S. 119).

Samen von Monocotyledonen enthalten oft völlig lineare Ketten von Mannanen und Glucomannanen, die über 1,4-verknüpft sind und deren Verteilung von Glucose und Mannose zufällig ist (Tab. 24, S. 120).

Bei einigen Palmaten kommen im reifen Samen Mannane vor, während in den unreifen Samen Galaktomannane zu finden sind, die sonst vor allem im Endosperm der Leguminosensamen anzutreffen sind (Tab. 25, S. 121). Im Gegensatz zu den Mannanen/Glucomannanen sind sie hochverzweigt, so daß ihre Lösungen sehr viskos sind - eine Eigenschaft, die sie zus. mit den sog. "Gummen" (Tab. 29, S. 125) für die Industrie so wertvoll macht.

Eine andere Gruppe von neutralen Schleimen kommt in Assoziation mit sauren Pflanzenschleimen vor, z.B. in Getreidearten: hochverzweigte Arabinoxylane. Die Xylankette ist stets 1,4 verknüpft und in unregelmäßiger Weise über C-3 an furanosidische Arabinosen gebunden. Ihre Struktur verleiht ihnen große Ähnlichkeit mit den Hemicellulosen. Daneben gibt es Xylane mit sauren Seitenketten (Tab. 26).

Eine große Gruppe von sauren Pflanzenschleimen besitzen eine alternierende Kette von Galakturonsäure und Rhamnose, wobei entweder Rhamnose oder Galaktose oder jeweils beide Zucker unterschiedlich substituiert sein können (Tab. 27), S. 123). In diese Gruppe gehören arabischer Gummi, Karaya Gummi (S. 125) und der schon lange aus der Volksmedizin bekannte Eibischschleim. Der pharmakologisch ähnlich wie der Eibischschleim wirkende Schleim aus dem Spitzwegerich dagegen besitzt wiederum einen Xylose-"backbone" mit Seitenketten aus Arabinose und Uronsäure (Tab. 26, S. 122). Ein anderes Schleimpolysaccharid mit Xylanstruktur kommt in *Ocimum basilicum* vor (Tab. 26, S. 122).

Der Schleim aus *Tamarindus indicus* gehört zu den sog. Amyloiden wegen der strukturellen Ähnlichkeit mit Cellulose und der daraus resultierenden Blaufärbung mit Jod (Tab. 28, S. 124).

Zahlreiche Autoren untersuchten Schleime aus verschiedenen Arzneidroge(n) auf ihre qualitative und quantitative Zuckers Zusammensetzung, ohne jedoch Strukturvorschläge zu machen. Die Ergebnisse lassen vorerst noch keine Klassifizierung zu, vor allem weil es sich bei vielen Schleimen um Polysaccharidgemische handelt.

Die Klassifizierung der erwähnten Schleime erfolgte lediglich nach Kriterien gemeinsamer Strukturmerkmale. Botanische Merkmale, wie z.B. Lokalisierung blieben unberücksichtigt.

Tabelle 23: Schleimpolysaccharide, die kovalent an Proteine gebunden sind

Pflanze/Familie	Literatur	Verhältnis Protein/Polysacch.
Abelmoschus glutinotextilis Malvaceae	140	1:3.9
Abelmoschus esculentus Malvaceae	119	1:8.1
Dioscorea botatas Dioscoreaceae	139	1:2.2
Sabal serrulata Arecaceae	37	bis 4% Protein
Achillea millefolium Compositae	36	1:4

Tabelle 24: Glucomannane und Mannane

Pflanze/Familie	Lit.	Verhältnis
<i>Lilium auratum</i> Liliaceae	141	Man/Glu 8:3 β -Man 1,4
<i>Narcissus tazetta</i> var. <i>chinensis</i> Amaryllidaceae	142	Man/Glu 5:1 β -Man verzweigt über C-3
<i>Dioscorea botatas</i> Dioscoreaceae	139	1,4 β -Man, 1/4 über 3 verzweigt O-Acetyl am C-6 (2 oder 3)
<i>Lycoris radiata</i> Amaryllidaceae	143	Man/Glu 12:1 β -Man 1,4
<i>Brasenia schreberi</i> Liliaceae	144	β -Man 1,3 verknüpft in den Seitenk.: Rha, Fuc, Gal, GluA
<i>Asparagus off.</i> Liliaceae	51	1,4 β -Man 3-6% 1,6 α -Glu
<i>Iris ochroleuca</i> Iridaceae	51	
<i>Iris sibirica</i> Iridaceae	51	

Tabelle 25: Galaktomannane (51)

Leguminosen:

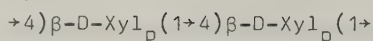
Man/Gal 1:1 bis 1:5
Hauptkette: 1.4 β -Man
Seitenkette: Über C-6 der Man
 eine Gal

Cyamopsis tetragonoloba
Ceratonia siliqua
Trigonella foenum-graecum
Colutea brevisialata
Tetragonolobus purpurens
Indigofera hirsuta

Nicht-Leguminosen:

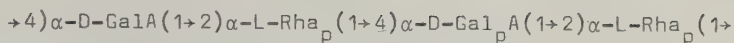
Annona muricata	Annonaceae
Convolvulus tricolor	Convolvulaceae
Ipomea muricata	Convolvulaceae
(unreife Samen aus Borassus flabellifer	
Coco nucifera	
Arenga saccharifera)	

Tabelle 26: Xylane



	Lit.	Seitenketten
Plantago major var. asiatica Plantaginaceae Samen	84 126	am C-2 $\rightarrow 1) \alpha\text{-L-Ara}_f (3 \rightarrow 1) \alpha\text{-D-Glu}_p \text{A}$ C-3 $\rightarrow 1) \alpha\text{-L-Ara}_f (3 \rightarrow 1) \alpha\text{-D-Gal}_p \text{A}$ C-3 $\rightarrow 1) \beta\text{-D-Xyl}_p (4 \rightarrow 1) \beta\text{-D-Xyl}_p$
Ocimum basilicum, Labiatae, Samen	127	in C-2/ $\rightarrow 1) \text{GalA}$ C-3 $\rightarrow 1) \text{Ara}_f (4/5 \rightarrow 1) \text{Rha}_p$ $\rightarrow 1) \text{Rha}_p (3 \rightarrow 1) \text{Xyl}_p$ $\rightarrow 1) \text{Ara}_f (2/3 \rightarrow 1) \text{Xyl}_p (4 \rightarrow 1) \text{Gal}_p \text{A}$
Linum usitatissimum Linaceae, Samen	150 129	D-Xylose, L-Arabinose
Cinnamomum zeyl. Lauraceae, Rinde	128	am C-2 und/oder C-3 $\rightarrow 1) \text{-L-Ara}_f$ $\rightarrow 1) \text{-L-Ara}_f (3 \rightarrow 1) \alpha\text{-D-Xyl}_p$
Sapota achras Sapotaceae (Sapote Gummi)	123	am C-2 $\rightarrow 1) \text{-D-Glu}_p \text{A}$ $\rightarrow 1) \alpha\text{-D-Glu}_p \text{A} (2 \rightarrow 1) \beta\text{-D-Xyl}_p (4 \rightarrow$ $\rightarrow 1) \text{-L-Ara}_{f/p}$
Cercidium australis Caesalpinaceae, (Brea Gummi)	125	am C-2 $\rightarrow 1) \text{-L-Ara}_p$ $\rightarrow 1) \text{-Glu}_p \text{A} (2 \rightarrow$ $\rightarrow 1) \text{-D-Xyl}_p$
Watsonia pyramidata Iridaceae (Watsonia Gummi)	130	am C-2/ $\rightarrow 1) \text{-L-Ara}$ C-3 $\rightarrow 1) \text{-L-Ara} (3 \rightarrow 1) \text{Gal}_p$ $\rightarrow 1) \text{Ara} (2 \rightarrow 1) \alpha\text{-L-Ara}_f (3 \rightarrow 1) \alpha\text{-Gal}$
Bromelia spp. Bromeliaceae	151	D-Xyl, L-Ara, D-Gal
Puya spp. Bromeliaceae		D-Xyl, L-Ara, D-Gal
Phormium tenax Liliaceae		D-Xyl, GluA

Tabelle 27: Rhamnogalakturonane



	Lit.	Verzweigungs- punkt	Seitenketten
Lepidium sativum Cruciferaee	145	4-Rha	-L-Rha(1→ -D-Gal(1→ 4-O-Me-GluA(1→4) Gal(1→ -D-Xyl(1→4) Gal(1→
Ulmus fulva Ulmaceae	146	3-Rha	3-O-Me-GalA(1→4)Gal(1→
Hydrangea paniculata Malvaceae	147	3-GalA	β-GluA(1→
Abelmoschus esculentus Malvaceae	119	4-Rha	Gal(1→4)β-GalA(1→
Althaea officinalis Malv., Blätter	45	3-GalA	β-GluA(1→
Althaea officinalis Malv., Wurzeln	44	3-GalA 4-Rha	β-GluA(1→ β-D-Gal(1→4)β-D-Gal(1→
Abelmoschus glutinotextilis Malv., Wurzeln	140	3-GalA 2-Rha	β-D-GluA(1→ β-D-GluA(1→3)α-D-GalA(1→

Succulenten:

Lit.

Opuntia ficus-indica, Cactaceae	148
Tillandsia aeranthos, Bromeliaceae	149
Malacocarpus ottonis, Cactaceae	149
Mesembryanthemum chilense, Aizoaceae	149

Tabelle 28: Sonstige Schleime

Lit.			
Hauptkette: β-D-Glu_p 1,4 verknüpft Seitenk. am C-6 $\rightarrow$1) α-D-Xyl_p $\rightarrow$1) α-D-Xyl_p (2$\rightarrow$1) α-D-Gal_p			
Tropaeolum majus, Tropaeolaceae	51	1:2:3	Gal:Xyl:Glu
Impatiens balsamina, Balsaminaceae	51	1:2:4-5	Gal:Xyl:Glu
Annona muricata, Annonaceae	51	1:1:4	Gal:Xyl:Glu
Tamarindus indica, Leguminosae	152	1:2:3	Gal:Xyl:Glu
Cassia multijuga, Leguminosae Samen	153	Hauptkette: $\rightarrow$4) β-D-Gal_p (1$\rightarrow$4) β-D-Xyl_p (1$\rightarrow$4) β-D-Gal_p (1$\rightarrow$4) β-D-Man_p (1$\rightarrow$4) eingliedrige Seitenketten	

Tabelle 29: Gummen (34) (Hauptkomponenten)

<u>Arabischer</u>	Hauptkette: β -D-Gal _p 1,3 verknüpft
<u>Gummi</u>	Seitenk.: β -D-Gal _p 1,6 stark verzweigt
(Acacia spp.)	über 3/4 mit L-Rha _p u. L-Ara _f
	Endgruppe: β -D-Glu _p A
<u>Ghatti Gummi</u>	Hauptkette: $\rightarrow 4$) β -D-Glu _p A(1 $\rightarrow$ 2) α -D-Man _p (1 $\rightarrow$ 4) β -D-Glu
(Anogeissus leiocarpus)	
<u>Khaya Gummi</u>	Hauptk.: $\rightarrow 4$) α -D-Gal _p A(1 $\rightarrow$ 2) α -L-Rha _p (1 $\rightarrow$ 4) α -D-Gal _p
(Khaya senegalensis)	Seitenkette: - α -D-Glu _p A
<u>Karaya Gummi</u>	Hauptkette: s.o.
(Sterculia urens)	Seitenkette: - β -D-Glu _p A
<u>Traganth</u>	Hauptkette: α -D-Gal _p A(1 $\rightarrow$ 4) α -D-Gal _p A(1 $\rightarrow$ 4) α -D-Gal
(Astragalus gummifer, A.mongh.)	mehrgliedrige Seitenketten über C-3 gebunden β -D-Xyl _p , α -L-Fuc _p , β -D-Gal _p

G. L I T E R A T U R V E R Z E I C H N I S

- 1) HAGER's Handbuch der Pharmazeutischen Praxis, Band V, 4.Ausg., Herausg.: LIST, P.H. und HÖRHAMMER, L., Springer-Verlag, Berlin 1975, S. 710
- 2) WAGNER, H., in "Pharmazeutische Biologie", in Teil 2: Drogen und ihre Inhaltsstoffe, Gustav-Fischer-Verlag, Stuttgart 1980, S. 59
- 3) DEUTSCHMANN, F., HOHMANN, B., SPRECHER, E. und STAHL, E., "Pharmazeutische Biologie", Gustav-Fischer-Verlag, Stuttgart 1979, S. 255
- 4) HOPPE, H.A., "Drogenkunde", Band 1, 8.Aufl., de Gruyter, Berlin 1975
- 5) Ph.Eur. III, Monographie: Matricariae Flos
- 6) STRASSBURGER, E., NOLL, F., SCHENCK, H. und SCHIMPER, A., "Lehrbuch der Botanik für Hochschulen", Gustav-Fischer-Verlag, Stuttgart 1971
- 7) Stoffliste, Herausg.: ABDA, 4.Aufl., 1982
- 8) EBERT, K., "Arznei- und Gewürzpflanzen", Wissenschaftl. Verlagsgesellschaft mbH., Stuttgart 1982, S. 114
- 9) HARNISCHFEGGER, G. und STOLZE, H., notabene medici, Journal f. Ärzte 10, 831 (1982)
- 10) WIGGLESWORTH, V.N., CA: 59: 3120 f
- 11) MEYER, F., Z.Naturforschung 7b, 61 (1952)
- 12) KÜHL, M., J.Am.Chem.Soc. 79, 5576 (1957)
- 13) SCHMIALEK, P., Z.Naturforschung 16b, 461 (1961)
- 14) STRANSKY, K., STREIBL, M. und UBIK, K., Fette, Seifen, Anstrichmittel 83, 347 (1981)
- 15) GIANITS, L. und KOCURIK, S., Farm.Obz. 48, 63 (1979)
- 16) v.BRUCHHAUSEN, R., Dissertation Frankfurt 1968
- 17) JANECKE, H. und KEHR, W., Plant.med. 10, 60 (1962)
- 18) JANECKE, H. und KEHR, W., Pharm.Ztg. 107, 432 (1962)
- 19) JANECKE, H. und KEHR, W., Pharm.Ztg. 107, 640 (1962)
- 20) JANECKE, H., KEHR, W. und WEISSER, W., Dtsch.Apoth.Ztg. 102, 398 (1962)
- 21) JANECKE, H. und KEHR, W., Arch.Pharm. 295, 183 (1962)
- 22) JANECKE, H. und WEISSER, W., Pharmazie 12, 528 (1964)
- 23) JANECKE, H. und WEISSER, W., Pharmazie 20, 637 (1965)
- 24) JANECKE, H. und WEISSER, W., Pharmazie 20, 580 (1965)
- 25) GORIN, A.C. und YAKOVLEV, A.I., Khim.Prir.Soedin. 10, 137 (1974)
- 26) GORIN, A.C. und YAKOVLEV, A.I., Khim.Prir.Soedin. 7, 515 (1971)
- 27) KIENHOLZ, M., Arzneimittel-Forsch. 13, 768, 920, 1109 (1963)
- 28) KRAUL, M. und SCHMIDT, F., Arch.Pharm. 290, 75 (1957)
- 29) WAT, C.K., JOHNS, T. und TOWERS, G.H.N., J.Ethnopharmacol. 2, 1979 (1980)
- 30) SUGANDA, A.G., AMOROS, M. und GIRRE, L., J.of Nat.Prod. 46, 626 (1983)
- 31) JANSZO, L., Nature 160, 227 (1947), zit. nach 1)
- 32) STERN, P. und MILIN, R., Arzneimittel-Forsch. 6, 445 (1956)
- 33) YAKOVLEV, A.I. und GORIN, A.C., Khim.Prir.Soedin. 2, 186 (1977)
- 34) ASPINALL, G.O., Adv.Chem.Biochem. 24, 333 (1969)

- 35) GOLDBERG, A.S., MÜLLER, E.C., EIGEN, E. und DESALVA, S.J., J.Pharm.Sci. 58, 938 (1969)
- 36) YAGI, A., HAMADA, K., MIHASHI, K., HARADA, N. und NISHIOKA, I., J.Pharm.Sci. 73, 62 (1984)
- 37) FLACHSBARTH, H., Dissertation Universität München 1979
- 38) MURAKAMI, I. und TANAKA, K., Chem.Pharm.Bull. 21, 1506 (1973)
- 39) MANOLOV, P., BOYADZHIEV, R. und NIKOLOV, P., Eksp.Med. Morfol. 3, 41 (1964), CA 62: 9652 (1965)
- 40) BELKIN, M., HARDY, W.G., PERRAULT, A. und SATO, H., Canc.Res. 19, 1050 (1959)
- 41) WHISTLER, R.L., BUSHWAY, A.A., SINGH, P.P., NAKAHARA, W. und TOKUZEN, R., Adv.Carbohydr.Chem.Biochem. 32, 235 (1976)
- 42) SHENG DING, F., YAN, Ch., XIAOYI, X., SHIKONG, Z. und MEILING, S., You Ji Hua Xue 2, 26 (1982), zit. nach 59)
- 43) DELAVEAU, P., LALLONETTE, P. und TESSIER, A.M., Plant.med. 40, 49 (1980)
- 44) TOMODA, M., KANEKO, S., EBASHI, M. und NAGAKURA, T., Chem.Pharm.Bull. 25, 1357 (1977)
- 45) TOMODA, M., SHIMIZU, N., SUZUKI, H. und TAKASU, T., Chem.Pharm.Bull. 29, 2277 (1981)
- 46) TOMODA, M., SHIMADA, K. und SHIMIZU, N., Chem.Pharm.Bull. 31, 2677 (1983)
- 47) YAKOVLEV, A.I., Khim.Prir.Soedin. 16, 248 (1980)
- 48) WEIR, D.M., "Handbook of Experimental Immunology in three Volumes", 3rd edition, Vol.II, Blackwell Scientific Publication, Oxford 1978, p. 31.25
- 49) TYMPNER, K.D., Ztschr.f.angewandte Phytotherapie 5, 181 (1981)
- 50) ALLEN, M.C., "Bioluminescence and Chemoluminescence", eds.: DE LUCA, M.A., McENROY, W.D., Academic Press, London 1981, p. 63
- 51) MEIER, H. und REID, J.S.G., "Reserve Polysaccharides Other Than Starch in Higher Plants" in "Encycl. of Plant Physiology", New Series, Vol. 13A, Plant Carbohydrates I, eds.: LOEWUS, F.A. and TANNER, W., Springer-Verlag, Berlin 1980, p. 458
- 52) TALMADGE, K.W., KEEGSTRA, K., BAUER, W.D. und ALBERSHEIM, P., Plant.Physiol. 51, 158 (1973)
- 53) TROLL, W., Allgemeine Botanik, 4.Aufl., Ferd.-Enke-Verlag, Stuttgart 1973, S. 220
- 54) McNEIL, M., DARVILL, A.G. und ALBERSHEIM, P., Fortschr.d. Chem.organ.Naturstoff 37, 191 (1979)
- 55) WILKIE, K., Adv. in Carbohydr.Chem.Biochem. 36, 215 (1981)
- 56) Documenta GEIGY, Wissenschaftl.Tabellen, 6.Aufl., Herausg.: J.R.GEIGY S.A., Basel 1960, S. 275
- 57) Pharmacia Fine Chemicals, "Gel Filtration", Theory and Practice, p. 17
- 58) NELSON, R.D., HERRON, M.J., SCHMIDTKE, J.R. und SIMMONS, R.L., Infect. and Immunity 513 (1977)
- 59) WAGNER, H. und PROKSCH, A., "Progress in Medicinal and Economic Plant Research", Vol.I, eds.: FARNSWORTH, N., HIKINO, H. und WAGNER, H., Academic Press, London, in press

- 60) MAZURAN, R., RABATIC, S., SABIONCELLO, A. und DEKARIS, S., *Allergy* 34, 24 (1979)
- 61) SCHULTEN, H.R., BAHR, U., WAGNER, H. und HERMANN, H., *Biomed.Mass.Spectrom.* 9, 115 (1982)
- 62) LAURENT, T.C., RYAN, M. und PIETRUSZKIEWICZ, A., *Biochim. Biophys.Acta* 42, 476 (1960)
- 63) ABDEL-AKHER, M., *J.Am.Chem.Soc.* 74, 4970 (1952)
- 64) TOWLE, G.A., "Methods in Carbohydrate Chemistry", Herausg.: WHISTLER, R.L., BEMILLER, J.N., Vol.VI, Academic Press, New York 1965, p. 510
- 65) BURGE, D.E., *J.Phys.Chem.* 67, 2590 (1963)
- 66) McNEILL, I.C., *Polymer* 4, 247 (1963)
- 67) DETERMANN, H., "Gel Chromatography", Springer-Verlag, Berlin 1968, S. 105
- 68) ASPINALL, G.O., "The Polysaccharides", Vol. I, ed. by G.O.ASPINALL, Academic Press, New York 1982
- 69) ADAMS, G.A., "Methods in Carbohydrate Chemistry", Vol. V, eds.: R.L.WHISTLER and J.N.BEMILLER, Academic Press, New York 1965, p. 269
- 70) BAUER, H., Dissertation Universität Tübingen 1975
- 71) DUTTON, G.J., "Glucuronic Acid, free and combined", Academic Press, New York 1966
- 72) DISCHE, Z., *J.Biol.Chem.* 167, 189 (1947)
- 73) BITTER, T. und MUIR, H.M., *Analyt.Biochem.* 4, 330 (1962)
- 74) TIMELL, T.E., *Adv. in Carbohydr.Chem.* 19, 251 (1954)
- 75) HIRST, E.L. und PERCIVAL, E., *Methods Carbohydr.Chem.* 5, 287 (1965)
- 76) HAKOMORI, S.I., *J.Biochem.(Tokyo)* 55, 205 (1964)
- 77) JANSSON, P.E., KENNE, L., LIEGREN, L., LINDBERG, H. und LÖNNGREN, J., *Chem.Comm.(Stockholm Univ.)* 8 (1976)
- 78) ASPINALL, G.O., "Chem.Characterization and Structure Determination of Polysaccharides", in "The Polysaccharides", Vol. I, ed.: ASPINALL, G.O., Academic Press, New York 1982, p. 35
- 79) LINDBERG, B. und LÖNNGREN, J., in "Meth. in Enzymology", Vol. 50, Part C, ed.: GINSBURG, V., Academic Press, New York 1978, p. 3
- 80) STEPHEN, A.M., "Other Plant Polysaccharides" in "The Polysaccharides", Vol. II, ed.: ASPINALL, G.O., Academic Press, New York 1983, p. 166
- 81) VOLLMAR, A., Dissertation Universität München 1984
- 82) LINDBERG, B., LÖNNGREN, J., THOMPSON, J.L. und NIMMICH, W., *Carbohydr.Res.* 25, 49 (1972)
- 83) TAYLOR, R.L. und CONRAD, H.E., *Biochem.* 11, 1383 (1972)
- 84) TOMODA, M., YOKOI, M. und ISHIKAWA, K., *Chem.Pharm.Bull.* 29, 2877 (1981)
- 85) BREITMAIER, E. und VOELTER, W., "¹³C-NMR-Spectroscopy" in Monographs in Modern Chemistry (5), Verlag Chemie, Weinheim 1978
- 86) GORIN, P.A.J., *Adv.Carbohydr.Chem.Biochem.* 38, 13 (1981)
- 87) BIOZZI, G. und BENACERRAF, B., *Br.J.Exp.Path.* 34, 441 (1953)
- 88) SHIMIZU, K., *Carbohydr.Res.* 92, 65 (1981)
- 89) SHASHKOV, A.S., SVIRIDOV, A.G., CHIZHOV, O.S. und KOVAC, P., *Carbohydr.Res.* 62, 11 (1978)
- 90) KOVAC, P., PETRAKOVA, E. und KOCIS, P., *Carbohydr.Res.* 93, 144 (1981)

- 91) HIRSCH, J., KOVAC, P., ALFÖLDI, J. und MIHALOV, V., Carbohydr.Res. 88, 146 (1981)
- 92) GAST, J.C., ATALLA, R.H., McKELVEY, R., Carbohydr.Res. 84, 137 (1980)
- 93) KOVAC, P. und HIRSCH, J., Carbohydr.Res. 100, 177 (1982)
- 94) NESZMELYI, A., persönliche Mitteilung
- 95) KOVAC, P. und HIRSCH, J., Carbohydr.Res. 85, 177 (1980)
- 96) ADAMS, G.A., "Meth.in Carbohydr.Chem.", Vol.V, eds.: WHISTLER, R.L., BEMILLER, J.N., Academic Press, New York 1965, p. 269
- 97) ASPINALL, G.O., in "The Polysaccharides", Vol.I, ed.: ASPINALL, G.O., Academic Press, New York 1982, p. 62
- 98) ASPINALL, G.O., in "The Polysaccharides", Vol.I, ed.: ASPINALL, G.O., Academic Press, New York 1982, p. 81
- 99) PAZUR, J.H. und FORSBERG, L.S., "Meth.in Carbohydr.Chem.", Vol.VIII, eds.: WHISTLER, R.L., BEMILLER, J.N., Academic Press, New York 1980, p. 107
- 100) LINDBERG, B. und LÖNNGREN, J., "Meth.in Carbohydr.Chem.", Vol.VII, eds.: WHISTLER, R.L., BEMILLER, J.N., Academic Press, New York 1976, p. 142
- 101) LINDBERG, B., LÖNNGREN, J. und THOMPSON, J.L., Carbohydr. Res. 28, 351 (1973)
- 102) ASPINALL, G.O., ROSELL, K.G., Phytochemistry 17, 919 (1978)
- 103) PAINTER, T., LARSEN, B., Act.Chem.Scand. 24, 2366 (1970)
- 104) HEIDELBERGER, M., Fortschr. der Chemie organ.Naturstoffe, 18, 503 (1960)
- 105) HEIDELBERGER, M., Fortschr. der Chemie organ.Naturstoffe, 42, 288 (1982)
- 106) HEIDELBERGER, M. und KENDALL, F.E., J.Exp.Med. 50, 809 (1929)
- 107) OUDIN, J., C.R.Hebd.Seances Acad.Sci. 222, 115 (1946)
- 108) OUCHTERLONY, O., Prog.Allergy 6, 30 (1962)
- 109) OUCHTERLONY, O. und NILSSON, L.A., "Immunodiffusion and Immunoelectrophoresis", in "Immunochimistry, Handbook of Experimental Immunology", Vol.I, 3.Aufl., ed.: WEIR, D.M., Blackwell Scientific Publication, Oxford 1979, p. 19
- 110) LARM, O. und LINDBERG, B., Adv.Carbohydr.Chem. 33, 295 (1976)
- 111) TOMODA, M., SATOH, N. und SHIMADA, K., Chem.Pharm.Bull. 28, 824 (1980)
- 112) TOMODA, M., SUZUKI, Y. und SATOH, N., Chem.Pharm.Bull. 27, 1651 (1979)
- 113) CALDES, G., PRESCOTT, B., THOMAS, C.A. und BAKER, P.J., J.Gen.Appl.Microbiol. 27, 157 (1981)
- 114) HEIDELBERGER, M. und TYLER, J.M., J.Exp.Med. 115, 711 (1964)
- 115) Le TURDU, M., Dissertation in Vorbereitung, München 1984
- 116) WEIDEMANN, M.J., PESKAR, B.A. und WROGEMANN, K., FEBS Letters 89, 136 (1978)
- 117) VOLLMAR, A., Dissertation Universität München 1984
- 118) KRAM, G., FRANZ, G., Plant.med. 49, 149 (1983)
- 119) TOMODA, M., SHIMADA, K., SAITO, Y. und SUGI, M., Chem. Pharm.Bull. 28, 2933 (1980)
- 120) KENNE, L., LINDBERG, B., SVENSSON, S., Carbohydr.Res. 40, 69 (1975)
- 121) BARKER, S.A. und SOMERS, P.J., in "The Carbohydrates, Chemistry and Biochemistry", Vol.II B, 2nd ed., eds.: PIGMAN, W., HORTON, D., Academic Press, London 1970, p. 582

- 122) RAO, C.V.N., Pure Appl.Chem. 42, 479 (1975)
- 123) HEIDELBERGER, M., New York, persönliche Mitteilung
- 124) DUTTON, G.G.S. und KABIR, S., Carbohydr.Res. 28, 187 (1973)
- 125) CEREZO, A.S., STACEY, M. und WEBBER, Y.M., Carbohydr.Res. 9, 505 (1969)
- 126) SANDHU, J.S., HUDSON, G.J. und KENNEDY, J.F., Carbohydr. Res. 93, 247 (1981)
- 127) ANJANEYALU, Y.Y. und GOWDA, D.Ch., Carbohydr.Res. 75, 251 (1979)
- 128) GOWDA, J.P., GOWDA, D.C. und ANJANEYALU, Y.V., Carbohydr. Res. 87, 241 (1980)
- 129) KALAC, J., Cesk.Farm. 19, 143 (1970), CA 73: 80438 n
- 130) SHAW, D.H. und STEPHEN, A.M., Carbohydr.Res. 1, 400 (1966)
- 131) BRANDT, L., Scand.J.Hematol.Suppl. 2 (1967)
- 132) PROKSCH, A., Dissertation Universität München 1982
- 133) CHIHARA, G., HAMURO, J., MAEDA, Y.Y., ARAI, Y. und FUKUOKA, F., Cancer Res. 30, 2776 (1970)
- 134) CHIHARA, G., HAMURO, J., MAEDA, Y.Y., ARAI, Y. und FUKUOKA, F., Nature 223, 943 (1970)
- 135) NISHIKAWA, Y., YOSHIMOTO, K., HORIUCHI, R., MICHISHITA, K., OKABE, M. und FUKUOKA, F., Chem.Pharm.Bull. 27, 2065 (1979)
- 136) REES, D.A., MORRIS, E.R., THOM, D. und MADDEN, K., "Shapes and Interactions of Carbohydrate Chains" in "The Polysaccharides", Vol.I, ed.: ASPINALL, G.O., Academic Press, London 1982, p. 224
- 137) DEA, I.C.M., REES, D.A., VEVEIDGE, J. und RICHARDS, G.N., Carbohydr.Res. 29, 363 (1979)
- 138) SABIONCELLO, A., RABATIC, S., KADRINKA-LOVRENCIC, M., OBERITER, V. und DEKARIS, D., Biomedicine 35 (1981)
- 139) TOMODA, M., ISHIKAWA, K. und YOKOI, M., Chem.Pharm.Bull. 29, 3256 (1981)
- 140) TOMODA, M., ARAI, M., SUZUKI, Y., OHMURA, M. und TAKAYAMA, H., Chem.Pharm.Bull. 28, 1546 (1980)
- 141) TOMODA, M., KANEKO, S. und NAKATSUKA, S., Chem.Pharm.Bull. 23, 430 (1975)
- 142) TOMODA, M., YOKOI, M., TORIGOE, A. und MARU, K., Chem.Pharm. Bull. 28, 3251 (1980)
- 143) TOMODA, M. und SHIMIZU, N., Chem.Pharm.Bull. 30, 3965 (1982)
- 144) KAKUTA, M. und MISAKI, A., Agric.Biol.Chem. 43, 1269 (1979), CA 91: 87314 f
- 145) TYLER, J.M., J.Chem.Soc. 5300 (1965)
- 146) BEVERIDGE, R.J., JONES, J.K.N., LOWE, R.W. und SZAREK, W.A., J.Polymer Sci., Part C, Polymer Symposia 23, 461 (1971)
- 147) TOMODA, M., SUZUKI, Y. und SATOH, N., Chem.Pharm.Bull. 27, 1651 (1979)
- 148) McGARVIE, D. und PAROLIS, H., Carbohydr.Res. 88, 305 (1981)
- 149) MOYNA, P. und TUBIO, R., Plant.med. 32, 201 (1955)
- 150) HUNT, K. und JONES, J.K.N., Can.J.Chem. 40, 1266 (1962)
- 151) HAMILTIN, J.K., SPRIESTERSBACH, D.R. und SMITH, F., J.Am.Chem.Soc. 79, 443 (1957)
- 152) KOOLMAN, P., Rec.Trav.Chim. 80, 849 (1961)
- 153) DUBEY, P., GUPTA, P.C., Carbohydr.Res. 72, 151 (1979)
- 154) GRUBERT, M., "Mucilage or gum in seeds and fruits of angiosperms, a review", Minverba Publikation München, 1981
- 155) NEWELL, G.W. und MAXWELL, W.A., US.Nat.Techn.Inform.Serv. Pb Rep. 1972, No. 221815/4
- 156) AMEMURA, A., HARADA, T., ABE, M. und HIGASHI, S., Carbohydr.Res. 115, 165 (1983)

Die vorliegende Arbeit entstand unter der Leitung von Herrn Professor Dr. H. Wagner am Institut für Pharmazeutische Biologie der Universität München.

Für die stete Unterstützung und großzügige Förderung, die mir Herr Professor Dr. Wagner bei der Durchführung dieser Arbeit zuteil werden ließ, möchte ich mich aufrichtig bedanken.

Mein ganz besonderer Dank gilt Herrn Dr. W. Schäfer am Max-Planck-Institut in Martinsried bei München für die Durchführung sämtlicher GC/MS-Analysen.

Mein aufrichtiger Dank gilt auch Herrn Dr. A. Liptak, Universität Debrecen/Ungarn, für die Einladung zu einem Aufenthalt an seinem Institut und für die für meine Arbeit wertvollen Anregungen. Herrn Dr. J. Harangyi möchte ich für die Aufnahmen der NMR-Spektren danken.

Für die Durchführung zahlreicher quantitativer Zuckeranalysen bin ich Herrn Dr. G. Wegener und seinen Mitarbeitern, Institut für Holzforschung der Universität München, zu Dank verpflichtet.

Für die Durchführung der pharmakologischen Untersuchungen danke ich Herrn Professor Dr. J. Drews, Fa.Sandoz, Forschungsinstitut GmbH., Wien, und Herrn Professor Dr. H. Stickl, Bayerische Impfanstalt, München, sowie Frau Dr. K. Jurcic und ihren Mitarbeitern an unserem eigenen Institut.

Für die großzügige Überlassung von Testsubstanzen möchte ich Herrn Professor G.O. Aspinall, Toronto/Kanada, Herrn Professor M. Tomoda, Tokyo/Japan und Herrn Professor Dr. G. Franz, Universität Regensburg, danken.

Darüberhinaus möchte ich an dieser Stelle den vielen nicht genannten Kollegen und Institutsangehörigen, die in verschiedenster Weise zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben, meinen aufrichtigen Dank aussprechen.

L E B E N S L A U F

Sabine Gertrud Maria O d e n t h a l

geb. am 27. Februar 1952 in München

Eltern: Dr.med. Friedrich Odenthal
Dr.med. Elisabeth Odenthal, geb. Hoferer

1958 - 1962 Volksschule, Freiburg im Breisgau

1962 - 1965 Berthold-Gymnasium, Freiburg

1965 - 1970 Grimmelshausen-Gymnasium, Offenburg

Juni 1970 Humanistisches Abitur am Grimmelshausen-Gymn.

SS 1970 -
SS 1972 Biologiestudium an der Universität Heidelberg

WS 1972 -
SS 1978 Studium der Pharmazie an der
Universität Genf/Schweiz

April 1974 Examen de sciences naturelles

Oktober 1975 Examen de validation de stage

Juni 1978 Diplome de pharmacien

1978/1979 Apothekenpraktikum in München

September 1979 Pharmazeutische Prüfung

23.10.1979 Approbation als Apothekerin

1979/1980 Tätigkeit in einer öffentlichen Apotheke in München

seit Mai 1980 Tätigkeit als wissenschaftliche Hilfskraft
am Institut für Pharmazeutische Biologie
der Universität München und
Beginn der Dissertation unter Leitung von
Professor Dr. H. Wagner

Oktober 1982 vier Wochen Forschungsaufenthalt an der
Universität Debrecen/Ungarn

